UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES MÉDICALES

Année 1971 — Thèse n° 75

LE TEST DE TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE A LA TUBERCULINE DANS LA TUBERCULOSE

A propos de 123 observations

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement le vendredi 14 mai 1971

PAR

Colette BIRABEN, née DESTRIBATS

le 5 septembre 1940, à BORDEAUX

Examinateurs de la Thèse :

MM. P. du PASQUIER, professeur .... *Président*,
P. FRÉOUR, professeur ..... *Juges*.
R. TESSIER, professeur ..... *Juges*.
J. BERNADOU, agrégé .....

IMPRIMERIE IDÉES/SERVICES s. a.
Avenue de Berlincan - 33 - Saint-Médard-en-Jalles
(Près Bordeaux)

1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543911_0039

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES MÉDICALES

Année 1971 — Thèse n° 75

LE TEST DE TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE A LA TUBERCULINE DANS LA TUBERCULOSE

A propos de 123 observations

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement le vendredi 14 mai 1971

PAR

Colette BIRABEN, née DESTRIBATS

le 5 septembre 1940, à BORDEAUX

Examinateurs de la Thèse

MM. P. du PASQUIER, professeur.... *Président,*

P. FRÉOUR, professeur ..... } *Juges.*

R. TESSIER, professeur ..... } *Juges.*

J. BERNADOU, agrégé ..... } *Juges.*

IMPRIMERIE IDÉES/SERVICES s. a.

Avenue de Berlincan - 33 - Saint-Médard-en-Jalles

(Près Bordeaux)

1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A LA MEMOIRE DE MON PERE

En témoignage de mon affection, je lui dédie plus particulièrement cette thèse, sachant que sa joie aurait été grande aujourd'hui.

A MA GRAND-MERE

A MA MERE

A MES BEAUX-PARENTS

A MON MARI

A MES ENFANTS

A TOUTE MA FAMILLE

A TOUS MES AMIS

A TOUS CEUX QUI M'ONT PERMIS
LA REALISATION DE CE TRAVAIL

AU PROFESSEUR JANINE MUSSINI-MONTPELLIER

Professeur d'anatomie-pathologique de la Faculté de Nantes

Biologiste des hôpitaux

Je vous dois beaucoup, votre gentillesse et votre grande compétence m'ont permis à Nantes un succès qui, sans vous, aurait été très difficile.

Je trouve ici l'occasion de vous témoigner toute mon affection et mon admiration.

AU DOCTEUR T. NACEF

Nous lui exprimons notre reconnaissance pour l'aide qu'il nous a apportée à ce travail.

AU PROFESSEUR J. DUHAMEL

Professeur de physique médicale et pharmaceutique
Ancien élève de l'Ecole Polytechnique.
Electroradiologiste des Hôpitaux
Officier des Palmes académiques
Chevalier de la Santé publique.

En remerciement des conseils qu'il a bien voulu nous donner pour la partie statistique de ce travail.

AU DOCTEUR JEAN-CLAUDE AURIOL

Par ton aide efficace, patiente et amicale, tu m'as permis de mener à bien ce travail. Tes conseils m'ont été précieux.

Je suis heureuse de t'exprimer ici mes remerciements et ma profonde gratitude.

A MADEMOISELLE GERMAINE SCHLINGER

A MADEMOISELLE MARIE-PIERRE MOREAU

Technicienne de l'I.N.S.E.R.M.

En remerciement pour l'aide technique précieuse qu'elles ont fournie.

A NOS JUGES

MONSIEUR LE DOCTEUR J. BERNADOU

Maître de conférences Agrégé de Médecine préventive
et Santé publique Hygiène (option clinique)
Médecin des Hôpitaux

Nous vous remercions d'avoir bien voulu faire partie de notre jury de thèse.

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. TESSIER

Professeur sans chaire de pneumo-phtisiologie
Médecin des Hôpitaux, chef de service
Chevalier de l'Ordre national du Mérite
Croix de guerre 1939-1945
Chevalier des Palmes académiques

Nous gardons un excellent souvenir de vos cours de pneumo-phtisiologie.
Nous vous remercions d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. FREOUR

Professeur d'hygiène et de clinique de pneumo-phtisiologie
Médecin des Hôpitaux, chef de service
Membre de la Commission de la tuberculose du Conseil supérieur de l'hygiène sociale
Expert de l'Organisation mondiale de la Santé
Chevalier de l'Ordre national du Mérite
Officier des Palmes académiques
Chevalier de la Santé publique
Chevalier de l'Ordre national du Sénégal

Elève dans votre service, nous avons pu admirer vos connaissances et votre grande humanité.
Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger cette thèse.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. DU PASQUIER

Professeur sans chaire (Bactériologie)

Biologiste des Hôpitaux, chef de service

Chevalier des Palmes académiques

Nous vous remercions d'avoir bien voulu nous confier ce travail.

Tout au long de la rédaction de cette thèse, nous avons pu apprécier votre grande gentillesse et votre patience pour nous guider et nous corriger.

Nous vous prions d'accepter le témoignage de notre respectueuse admiration et de notre reconnaissance.

SOMMAIRE

INTRODUCTION 21

HISTORIQUE 23

1. Généralités sur le lymphocyte 23
2. Le test de transformation lymphoblastique 24

MATERIEL ET METHODES 29

1. Choix des sujets 29
2. Techniques 30

RESULTATS 33

A. Expériences réalisées avec la tuberculine standard de l'OMS 33

B. Expériences réalisées avec la tuberculine IP 48 et l'antigène de Middlebrook 47

C. Comparaison de résultats de TTL à la tuberculine IP 48 et de résultats de TTL à la tuberculine de l'OMS chez des malades tuberculeux à IDR positive théoriquement comparables 51

D. TTL et culture de BK
TTL et diagnostic clinique 52

DISCUSSION 55

A. Techniques 55
   1. Prélèvement, quantité et anticoagulant 56
   2. Sang total ou lymphocytes purifiés ? 57
   3. Milieux de culture et durée de la culture 58
   4. Antigènes 60

B. Interprétation du test 66

C. Comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature 67

PERSPECTIVES D'AVENIR 73

CONCLUSIONS 77

BIBLIOGRAPHIE 81

INTRODUCTION

Pendant plus de soixante ans, la recherche de l'« allergie » s'est faite uniquement par des tests cliniques, dont les réactions cutanées ou intradermiques étaient de très loin les plus répandues. Il s'agit là de méthodes empiriques dont l'intérêt reste grand, surtout en raison de l'expérience que les cliniciens et les épidémiologistes ont acquise dans ce domaine. Mais, outre le danger qu'elles peuvent parfois présenter, les limites diagnostiques de ces tests semblent avoir été atteintes, et surtout les découvertes récentes sur le rôle du lymphocyte dans l'immunité ont permis la mise au point de techniques de recherches *in vitro* qui ont l'avantage de se prêter plus facilement à une expression chiffrée des résultats.

Parmi ces méthodes, le test de transformation lymphoblastique (TTL) a déjà fait l'objet de nombreuses études. Il semble surtout intéressant dans l'appréciation de l'hypersensibilité retardée. C'est cette dernière qui est en cause dans les phénomènes allergiques survenant au cours des maladies infectieuses. Il était tout naturel d'appliquer cette méthode à l'allergie tuberculinique.

Le but de ce travail est précisément d'exposer les résultats d'une enquête poursuivie au Centre Xavier-Arnozan et portant sur la recherche de l'allergie tuberculinique chez des sujets tuberculeux et chez des témoins non tuberculeux.

Il a été réalisé au Laboratoire de Biologie de ce centre (Pr du Pasquier) et n'a été possible que grâce à la collaboration

des services des professeurs FRÉOUR et TESSIER (pneumophtisiologie) et CHOUSSAT (médecine générale) que nous tenons à remercier très vivement.

Après une introduction générale sur le test de transformation lymphoblastique et l'exposé des techniques adoptées, nous analyserons les résultats obtenus chez des sujets tuberculeux et non tuberculeux avec une tuberculine standardisée de l'OMS, avec la tuberculine IP 48 et avec l'antigène de Middlebrook.

La discussion abordera différents problèmes purement techniques et surtout l'interprétation des TTL et leur corrélation avec les tests cutanés.

Enfin, une comparaison entre nos propres résultats et ceux d'autres auteurs montrera combien ce chapitre de la physiopathologie est encore en pleine évolution et combien la compréhension même des phénomènes d'hypersensibilité retardée reste encore incomplète à l'heure actuelle.

HISTORIQUE

1. GENERALITES SUR LE LYMPHOCYTE

Nous sommes loin aujourd'hui de la définition du lymphocyte émise par RANVIER (41) en 1900. Il considérait cette cellule comme dénuée de toute potentialité évolutive : « incapable de se diviser, de courte durée de vie, et dont la fonction essentielle consiste à fournir les éléments constitutifs de la lymphe, humeur nourricière des tissus ».

Mais le chemin qui a conduit les chercheurs jusqu'à nos connaissances actuelles a été long et hésitant, ce n'est que très progressivement que l'on a découvert l'immense potentialité de cette petite cellule.

La définition de RANVIER a cependant été assez vite remise en question. Dès 1936, Arnold RICH (44), professeur de pathologie à l'Ecole de Médecine de l'Université de Johns-Hopkins, soupçonnant le lymphocyte de jouer un rôle capital dans l'organisme, s'est ému de l'ignorance actuelle de ses fonctions ; mais si, dans les années suivantes, on progresse dans la connaissance anatomique du lymphocyte, on ignore encore beaucoup de choses concernant sa physiologie, jusqu'à ce que HARRIS et ses collaborateurs, dès leurs premiers travaux en 1945 (16), puis en 1949 (17) et 1954 (18), mettent en évidence une synthèse d'anticorps par les lymphocytes. Des preuves nombreuses vont ensuite s'élaborer en faveur de cette thèse.

Le problème du lymphocyte va changer : POLICARD et BESSIS (39) disent en 1960 : « La question du lymphocyte s'est considérablement élargie, elle a de beaucoup dépassé les préoccupations de classification histologique et pris une importance croissante du fait du rôle possible des cellules lymphocytiformes dans les processus immunologiques. »

Aujourd'hui, nous savons que le petit lymphocyte est l'élément central de la réaction immunologique. Il est indispensable dans la réaction d'hypersensibilité retardée.

2. LE TEST DE TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE

Une meilleure connaissance des fonctions du lymphocyte nous a appris que cette cellule, sous l'effet d'une stimulation antigénique, devenait susceptible de se transformer en cellule non différenciée, capable de se diviser.

On a donné le nom de blastogénèse à ce phénomène.

Cette blastogénèse se produit *in vivo* dans toutes les circonstances qui préludent à l'initiation d'une réaction immunologique. Depuis quelques années, l'observation de ce phénomène *in vitro* passionne les chercheurs et ils ont donné au test *in vitro* le nom de TEST DE TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE (TTL).

Les substances blastogéniques capables d'induire une transformation lymphoblastique *in vitro* sont de deux sortes :

a) *Des substances non spécifiques.*

Elles sont nombreuses ; les plus utilisées sont des protéines extraites des légumineuses, et en particulier la phyto-hémagglutinine (PHA) extraite d'un haricot du genre *Phaseolus Vulgaris.*

Depuis le début du siècle, la PHA était connue pour ses propriétés hémagglutinantes ; on lui a découvert peu après des propriétés leucoagglutinantes ; mais la révélation la plus importante

a eu lieu en 1959 : HUNGERFORD (25) découvrit que la PHA déterminait une transformation lymphoblastique de 70 à 90 % des lymphocytes de tous les individus normaux.

b) *Des substances spécifiques.*

Elles peuvent s'identifier à tous les antigènes vis-à-vis desquels l'individu présente une hypersensibilité. La réponse blastogénique est positive aussi bien dans les états d'hypersensibilité humorale que dans les états d'hypersensibilité cellulaire. L'intérêt du TTL apparaît de façon évidente pour explorer l'état immunologique des individus.

— *Les allergies médicamenteuses* qui sont des maladies par hypersensibilité de type immédiat ont fait l'objet de nombreuses études : la pénicilline, l'aspirine, les antibiotiques sont parmi les médicaments qui ont été le plus souvent testés.

— *Les allergies microbiennes* dues le plus souvent à des manifestations d'hypersensibilité de type retardé ont été étudiées dès 1963 : LYCETTE et PEARMAIN (30) cultivent des lymphocytes d'individus immunisés avec l'antigène de la poliomyélite : l'addition de 0,2 ml de vaccin de Sabin aux cultures produit une transformation blastique des lymphocytes, et des mitoses dans tous les cas.

ELVES et ses collaborateurs (12-13) observent que l'anatoxine tétanique, le vaccin typho-parathyphique, le vaccin de la coqueluche, l'anatoxine diphtérique, le vaccin antipoliomyélitique et le vaccin de la variole sont capables d'induire une blastogénèse quand ils sont ajoutés aux cultures de lymphocytes, provenant de malades sensibilisés à ces antigènes.

HIRSCHHORN (22) rapporte des résultats semblables avec l'anatoxine diphtérique et le vaccin de la coqueluche.

Au sein des maladies bactériennes, la tuberculose a été une des affections les plus étudiées. Au début du siècle, la découverte de l'allergie tuberculinique par VON PIRQUET a contribué à rendre possible l'étude de l'infection tuberculeuse latente, et à aider au

diagnostic de la tuberculose. Par la suite, on a cherché à préciser les relations entre la tuberculose maladie, et l'intensité des réactions tuberculiniques.

En 1926, bien avant la découverte du TTL, deux auteurs russes : TIMOFEJEMSKY et BENEWELENSKAJA (50-51) avaient déjà pensé pouvoir tester l'allergie tuberculinique *in vitro* en présence de bacilles tuberculeux vivants : seuls les lymphocytes de sujets immunisés subissaient des modifications morphologiques, aboutissant à ce que les auteurs appelaient « des cellules épithélioïdes ».

Il fallut attendre la découverte d'HUNGERFORD sur l'action de la PHA pour que des substances extraites du bacille tuberculeux soient mises au contact de lymphocytes en culture, donnant ainsi une autre possibilité d'explorer l'allergie tuberculinique.

PEARMAIN et LYCETTE (38), SCHREK (45), HIRSCHHORN (22), MARSHALL et ROBERTS (33), en 1963, montrent tous que l'addition d'un dérivé protéinique purifié de tuberculine aux cultures de lymphocytes d'individus sensibles à la tuberculine, induit l'apparition de cellules blastiques et de mitoses.

D'autres chercheurs obtiennent des résultats analogues avec la « vieille tuberculine » : COWLING, QUAGLINO et DAVIDSON (10), HEILMAN et McFARLAND (20) comparent l'activité mitogénique relative de PPD-S : tuberculine internationale standard des mammifères contenant 5,9 % de polysaccharides avec des tuberculosaccharides de composition chimique connue.

Depuis ces premières expérimentations, les travaux portant sur les substances extraites de la tuberculine ont fait l'objet de beaucoup de publications : ASPEGREN et RORSMAN (1), COWLING et QUAGLINO (9), RAUCH (42) et beaucoup d'autres, dont nous parlerons dans un chapitre suivant.

Les efforts ont porté principalement sur l'amélioration des techniques de culture des lymphocytes [DEBRAY-SACHS et DORMONT (11), MAUPIN - GENESTE (35)]. On a cherché à remplacer les méthodes actuelles : comptage du nombre de cellules blastiques

et de mitoses par rapport au nombre de lymphocytes, par des méthodes faisant appel au marquage radio-actif des précurseurs des acides nucléiques incorporés dans les lymphocytes transformés [Caron et Sarkany (6) - Hartog (19) - Caron (4)].

Certains auteurs enfin se sont surtout appliqués à analyser de façon approfondie et à expliquer au point de vue immunologique le rapport entre le test de transformation lymphoblastique à la tuberculine et les tests immunologiques cutanés comme l'intra-dermo-réaction à la tuberculine : Matsianiotis et ses collaborateurs (34), Kravis et ses collaborateurs (28), McFarland et Heilman (32), Gump et ses collaborateurs (14) et Kerby (26).

C'est vers ce but qu'ont aussi porté nos efforts.

Nous exposons dans le chapitre suivant le résultat de travaux portant sur l'examen de 123 sujets.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. CHOIX DES SUJETS

Nous avons pratiqué le test de transformation lymphoblastique à la tuberculine sur 123 sujets répartis en 4 groupes :

1er groupe :

27 sujets témoins à IDR négative, dont 10 sont pris parmi le personnel du service, les 17 autres étant des personnes âgées d'une maison de retraite.

2e groupe :

39 sujets témoins à IDR positive, 24 appartenant au personnel du service, les 15 autres sont des pensionnaires de la même maison de retraite.

3e groupe :

29 malades tuberculeux à IDR positive dont la grande majorité est atteinte de tuberculose pulmonaire ; 19 sont des enfants.

4e groupe :

28 malades tuberculeux, dont 17 avec une IDR positive, 2 avec une IDR négative, 9 dont l'IDR n'est pas connue.

Nous les avons groupés à part, car nous n'avons pas employé pour eux la même tuberculine que pour les autres groupes.

2. TECHNIQUES

A. *Tests tuberculiniques cutanés.*

L'IDR a été pratiquée par injection intradermique à l'avant-bras, de 10 unités de tuberculine IP 48 ou de tuberculine standard de l'OMS et nous avons lu la réaction cutanée 48 heures après.

N'ont été considérés comme positifs que les tests donnant une zone d'induration de diamètre moyen supérieur à 5 mm.

Dans certains cas, nous avons défini un type de l'IDR qui correspond à la sensation que l'on a, à la palpation de la zone d'induration.

Selon l'importance de l'élevure, on parle d'un type I, II, III ou IV. Le type I répond aux réactions les plus denses et nettement surélevées, bien délimitées, celles du type IV sont les moins intenses avec une induration diffuse à la limite de la perception ; les types II et III sont intermédiaires.

B. *Le test de transformation lymphoblastique.*

10 ml de sang sont prélevés aseptiquement sur héparine (30 u/ml) puis filtrés sur une colonne de coton hydrophile pour éliminer les monocytes et les polynucléaires.

Le filtrat est recueilli dans des tubes à centrifuger, puis centrifugé à 300 tours minute pendant 15 minutes.

Le plasma est prélevé, la couche plaquettaire éliminée. La couche leucocytaire est recueillie et mélangée avec un égal volume de plasma déplaquetté. Une numération à la cellule de Malassez montre que ce matériel contient entre 2 000 et 6 000 lymphocytes au mm^3, et que pratiquement tous les polynucléaires et monocytes ont disparu. Seuls persistent souvent des éosinophiles.

La réaction est effectuée en tubes de Leifson et comprend pour chaque série les réactifs suivants :

4 ml de milieu de Parker 199

100 u/ml de Pénicilline

150 mcg/ml de streptomycine.

4 gouttes de suspension lymphocytaire dans du plasma autologue,

et selon les cas :

rien pour le tube témoin

0,05 ml de PHA Difco

et 20, 30, 50, 70 et 100 u/ml de tuberculine de l'OMS ou d'IP 48 selon les cas.

Puis ces tubes sont placés à l'étuve à 37° pendant 72 heures.

Au bout de ce laps de temps, le surnageant est décanté et le culot est placé sur 2 lames propres et dégraissées, de 40 × 15 mm, en frottis à queue rectiligne. La coloration est faite avec du MGG classique.

Lecture : les frottis sont examinés sur toute leur longueur. La plupart des cellules sont toutefois retrouvées dans la queue du frottis. Le pourcentage de cellules transformées est établi sur 500 cellules.

D'autre part, pour chaque sujet, le TTL a été réalisé avec des concentrations différentes de tuberculine ; c'est volontairement, comme nous le verrons dans la discussion, que nous avons utilisé des quantités relativement faibles de tuberculine. Le résultat que nous avons retenu pour l'analyse globale des statistiques est toujours le résultat maximum obtenu avec l'une quelconque des diverses concentrations de tuberculine.

RÉSULTATS

A. EXPERIENCES REALISEES AVEC LA TUBERCULINE STANDARD DE L'OMS

Dans cette série d'expériences, nous exposerons successivement :

— Les résultats obtenus chez des témoins non tuberculeux à IDR négative,

— Les résultats obtenus chez des témoins non tuberculeux à IDR positive,

— Les résultats obtenus chez des tuberculeux évolutifs.

I. GROUPE DE 27 TEMOINS A IDR NEGATIVE

1° *Répartition des pourcentages de transformation lymphoblastique obtenue avec la PHA* (Fig.1).

Ce calcul des pourcentages de transformation lymphoblastique obtenue avec la PHA a été fait pour montrer la viabilité des lymphocytes utilisés.

En dehors de 2 sujets qui avaient un TTL négatif à la tuberculine et qui ont eu l'un 50 %, l'autre 70 % de transformation lymphoblastique à la PHA, tous les autres ont eu entre 70 et 100 %.

Ces résultats témoignent de la bonne viabilité des lymphocytes. Ils montrent également que même chez des sujets non allergiques à la tuberculine, la réponse non spécifique est quasi constante.

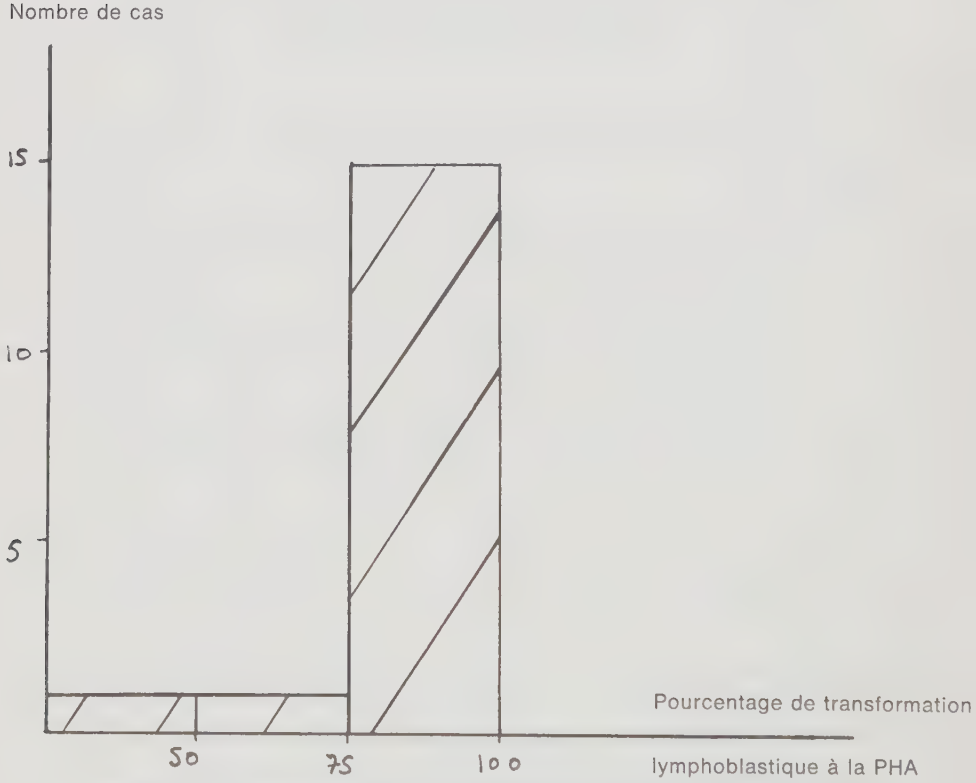

Figure 1. — *Répartition des pourcentages de transformation lymphoblastique à la PHA chez 17 témoins à IDR négative.*

2° *Répartition des pourcentages de transformation lymphoblastique à la tuberculine de l'OMS* (Fig. 2).

Nous avons observé 20 TTL négatifs, soit 74 %. Il faut noter que sur nos 27 sujets, 17 étaient des personnes âgées dont 2 ont eu chacune 1 % seulement de cellules transformées, et 2 autres moins de 1 %. Il semble que les personnes âgées aient un pourcentage d'induction généralement plus faible que les adultes jeunes, ce que nous vérifierons tout au long de nos résultats.

Les 3 autres résultats positifs ont eu : 3,2 et 1 % de cellules transformées.

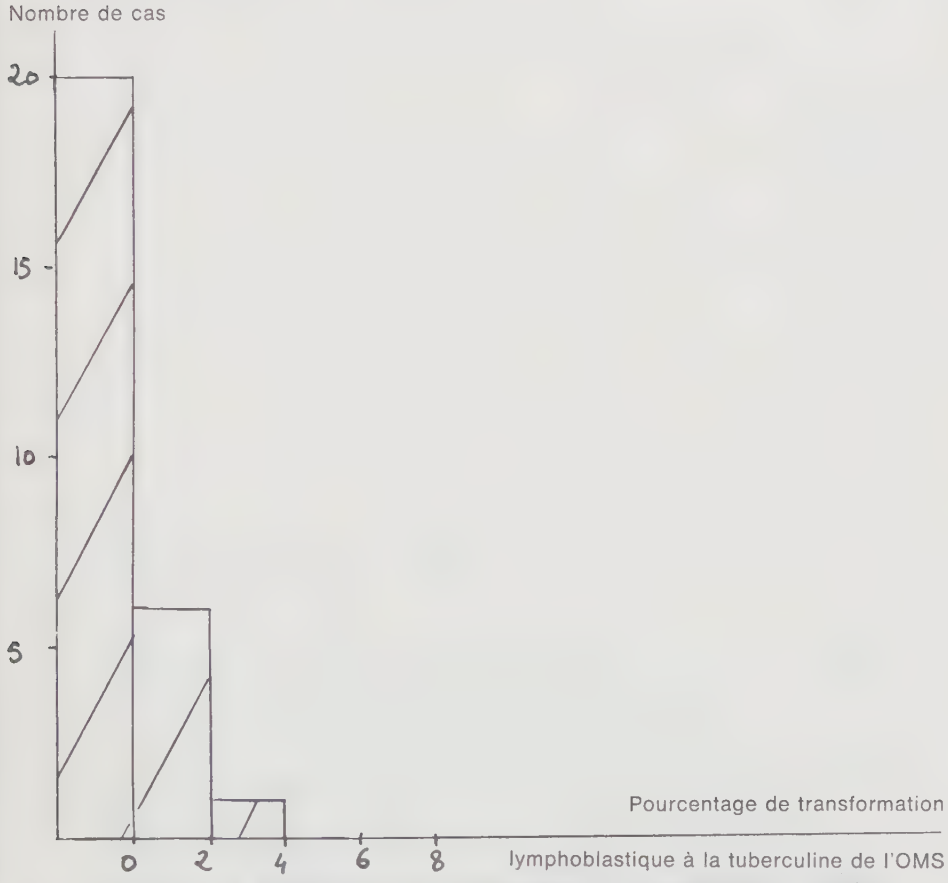

Figure 2. — *Répartition des pourcentages de transformation lymphoblastique à la tuberculine de l'OMS chez 27 témoins à IDR négative.*

La moyenne générale de cellules transformées est de 1,3 % pour les 7 cas positifs.

3° *Influence de la concentration de la tuberculine de l'OMS sur la positivité des tests* (Fig. 3).

Nous avons utilisé trois concentrations différentes de tuberculine : 20, 30, 50 unités.

Les résultats les plus importants ont été obtenus avec 50 unités.

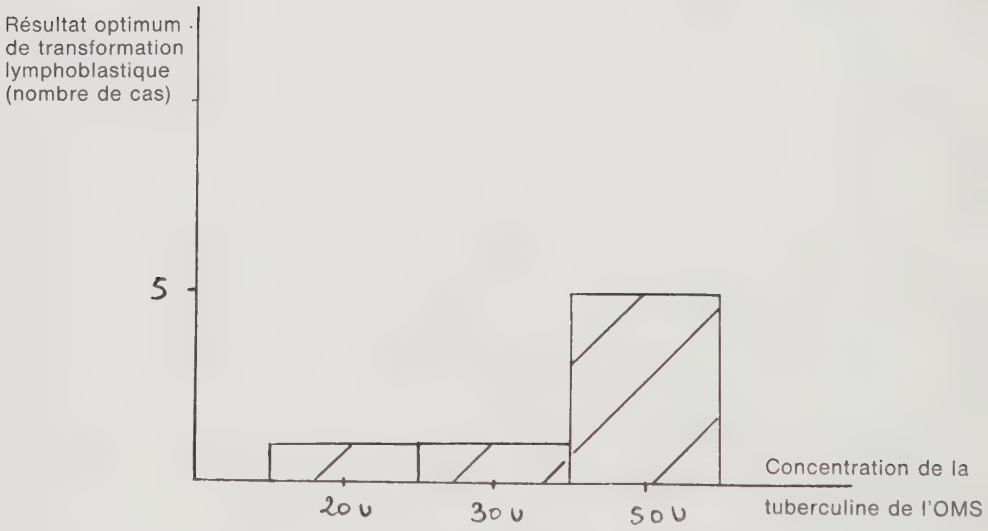

Figure 3. — *Chez 7 témoins à IDR négative dont les TTL étaient positifs : répartition de la concentration de tuberculine donnant le pourcentage de transformation lymphoblastique le plus élevé.*

EN CONCLUSION, les sujets témoins à IDR négative ont un TTL négatif dans 75 % des cas, et faiblement positif dans 25 %. La plupart du temps, le TTL n'est positif que pour de fortes concentrations de tuberculine.

II. GROUPE DE 39 TEMOINS A IDR POSITIVE

1° *Répartition des pourcentages de transformation lymphoblastique à la PHA* (Fig. 4).

Hormis un cas avec 70 % de transformation, tous les autres se situaient autour de 80 et 100 %, révélant un excellent état de viabilité des lymphocytes utilisés.

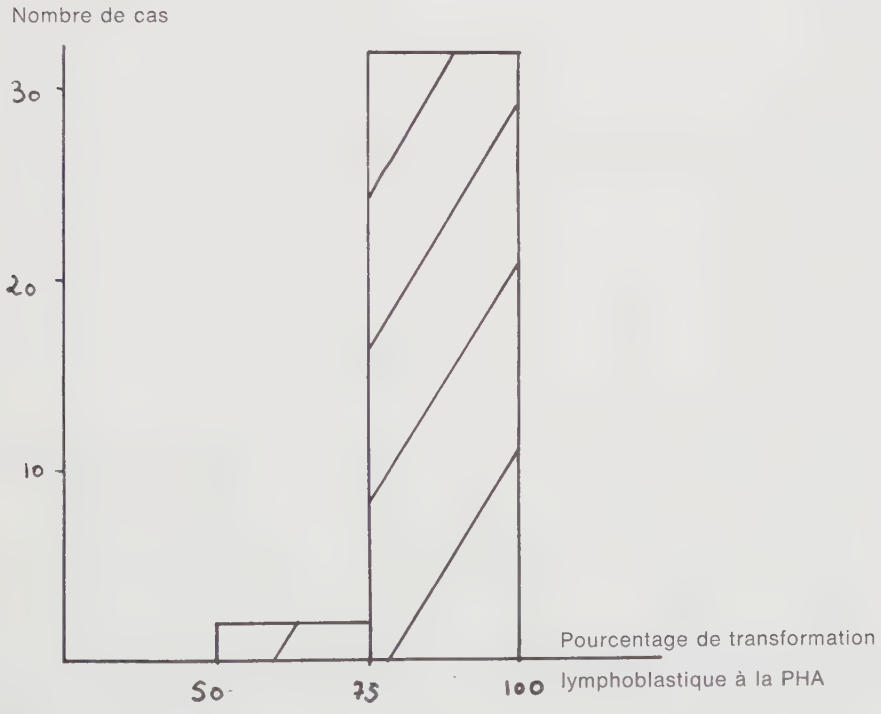

Figure 4. — *Répartition des pourcentages de transformation lymphoblastique à la PHA chez 32 sujets sains à IDR positive.*

2° *Répartition des pourcentages de transformation lymphoblastique à la tuberculine de l'OMS* (Fig. 5).

Nous avons obtenu 20 TTL positifs, ce qui donne un pourcentage de 51 %.

Sur ces 39 sujets, 15 étaient des personnes âgées, chez lesquelles le pourcentage de transformation lymphoblastique a été plus faible qualitativement et quantitativement que chez les autres sujets, puisque 4 seulement ont eu un TTL positif dont les valeurs étaient comprises entre 0 et 2 %. Il est à noter que le résultat des tests cutanés était faible.

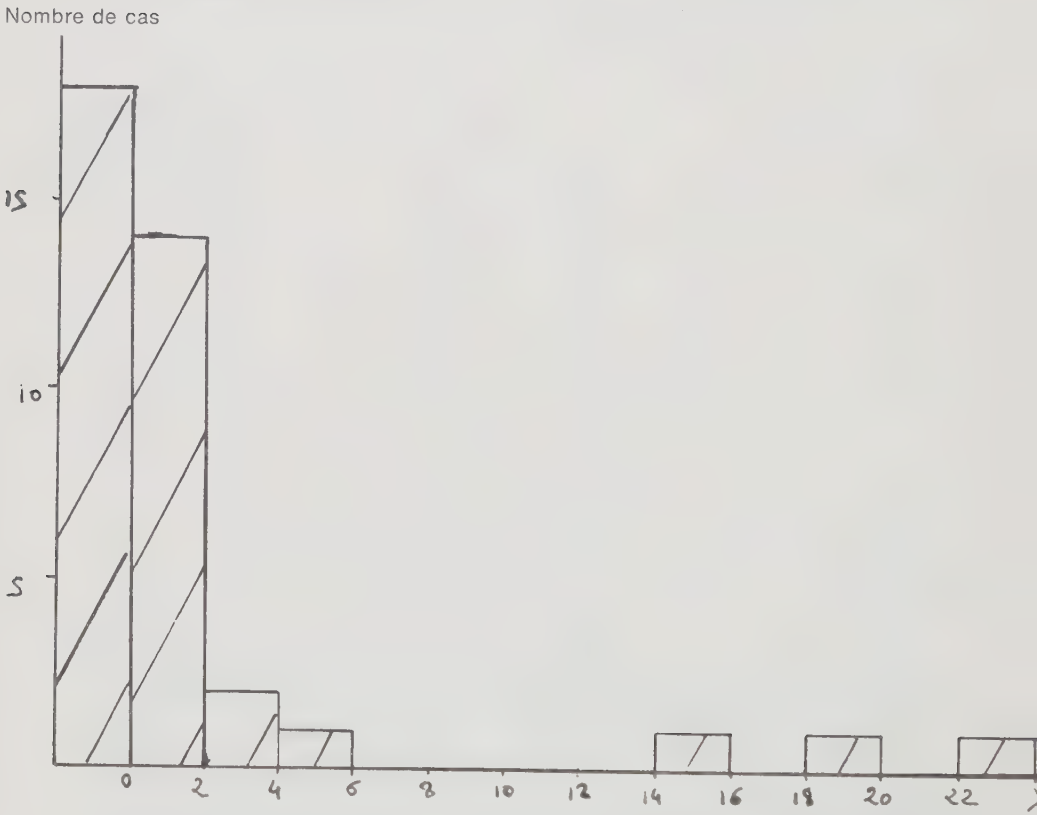

Figure 5. — *Répartition des pourcentages de transformation lymphoblastique à la tuberculine de l'OMS chez 39 sujets sains à IDR positive.*

Considérés séparément, les résultats obtenus chez les 15 personnes âgées, pensionnaires d'une maison de retraite, et ceux obtenus à partir de sujets plus jeunes, montrent que le taux de transformation lymphoblastique est de 33 % chez les premiers et de 66 % chez les seconds.

L'ensemble des résultats se situe comme chez les sujets à IDR négative entre 0 et 2 %, à l'exception de 3 cas qui dépassent 15 % de cellules transformées. On peut se demander si ces sujets n'ont pas subi une vaccination récente par le BCG, un virage de cuti ou une réinfestation passée inaperçue, qui expliquerait leurs pourcentages élevés de transformation lymphoblastique.

Le pourcentage général de transformation lymphoblastique est de 4,06, mais il faut remarquer que si l'on exclut les 3 cas précédents, il tombe à 1,6.

3° *Répartition des diamètres de l'IDR* (Fig. 6).

Chez 28 sujets, nous avons pu faire une IDR et en mesurer le diamètre. Le plus grand nombre de diamètres se situe entre 10 et 15 mm.

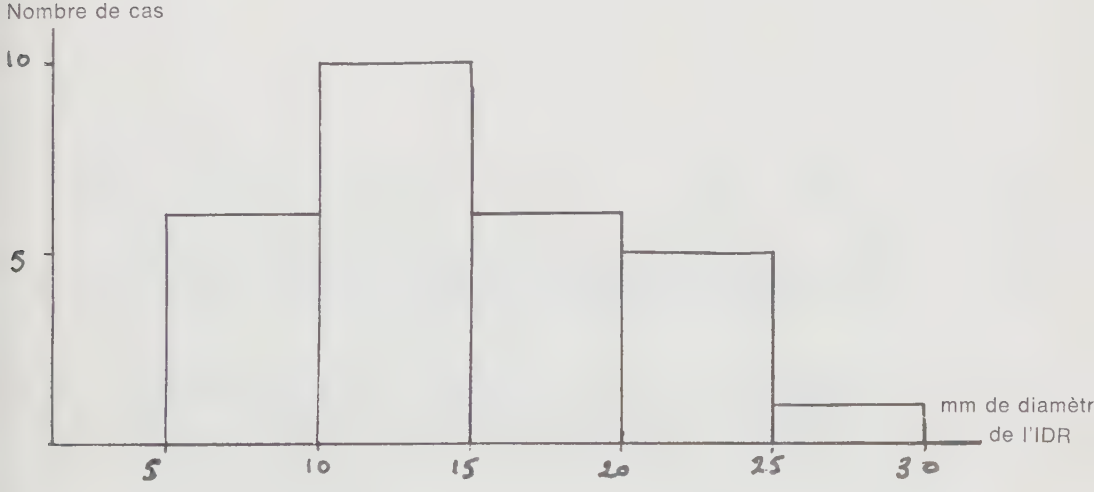

Figure 6. — *Répartition des diamètres de l'IDR chez 28 témoins à IDR positive mesurée.*

4° *Influence de la concentration de la tuberculine* (Fig. 7).

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la concentration la plus élevée de tuberculine, c'est-à-dire avec 50 unités, comme dans le groupe précédent.

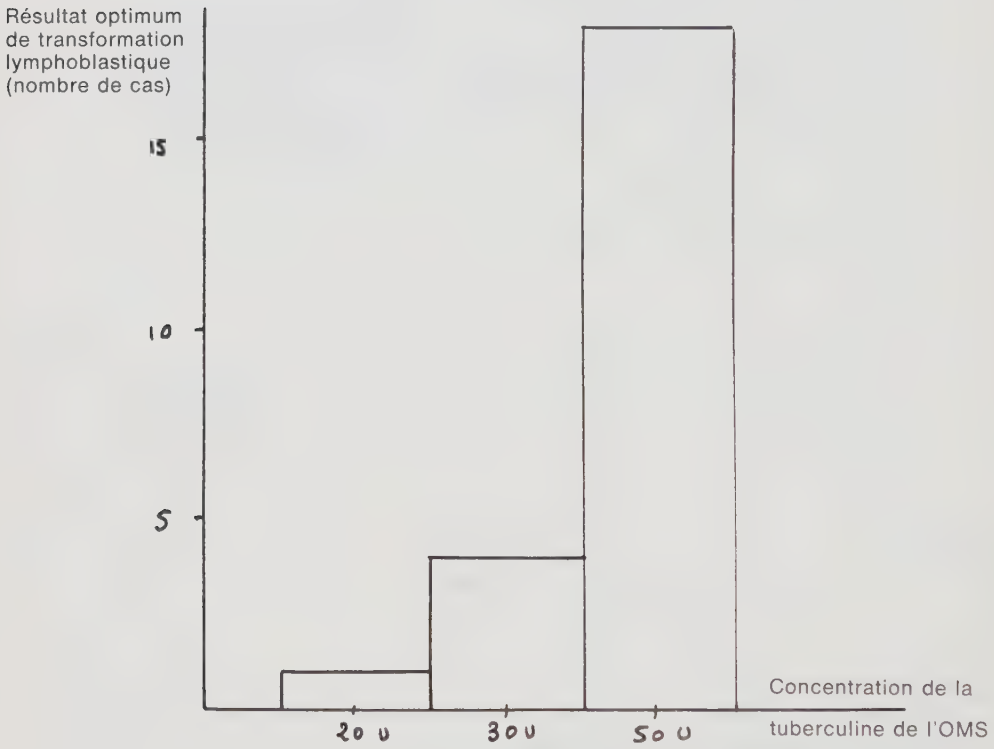

Figure 7. — *Répartition de la concentration de tuberculine de l'OMS donnant le pourcentage de transformation lymphoblastique le plus élevé chez 20 sujets à IDR positive dont les TTL étaient positifs.*

5° *Comparaison entre le diamètre de l'IDR et le pourcentage de transformation lymphoblastique à la tuberculine* (Fig. 8).

Il n'y a pas de corrélation entre ces deux paramètres car, si nous avons bien eu un certain étalement dans la valeur du diamètre de l'IDR, au contraire, comme nous l'avons vu pour le pourcentage

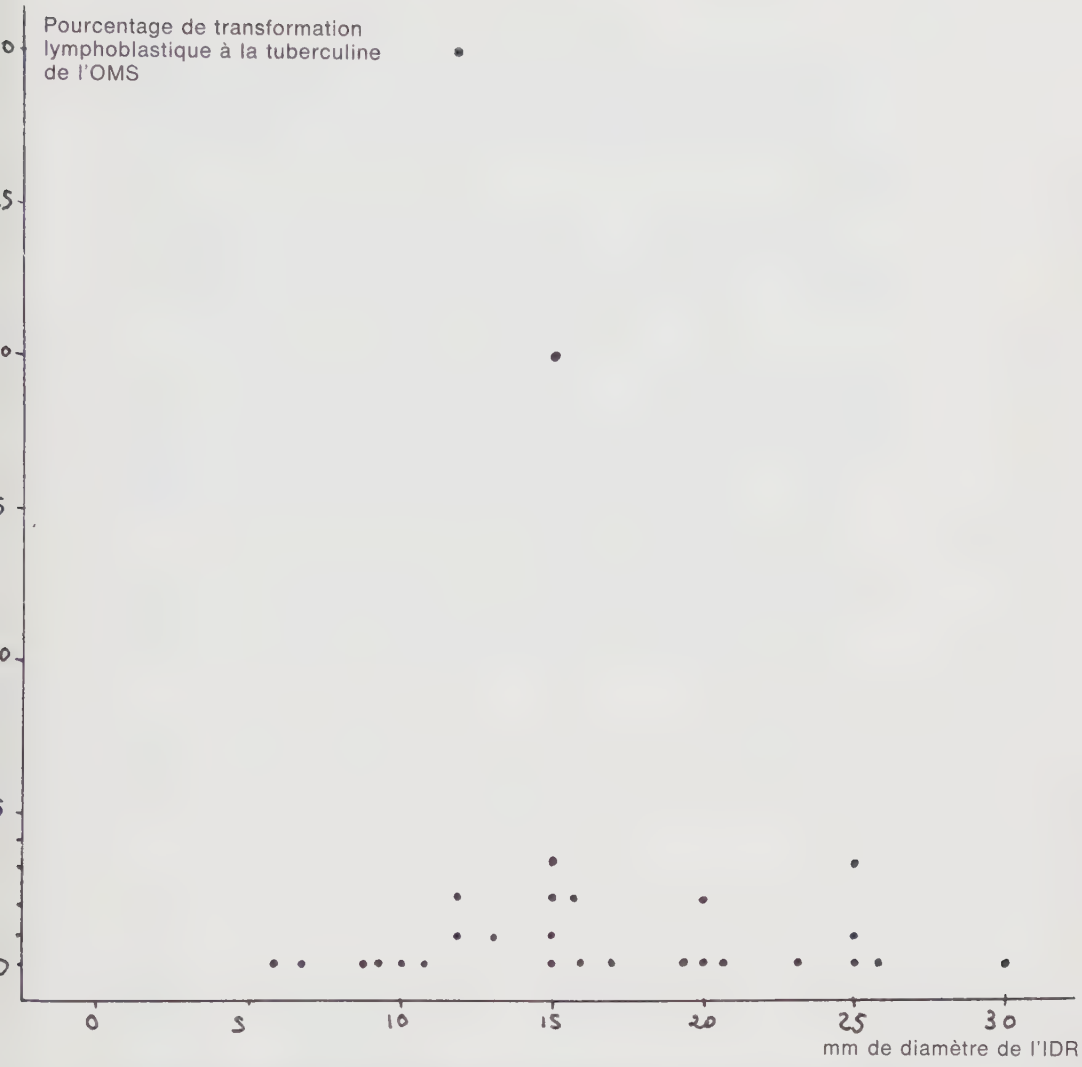

Figure 8. — *Corrélation entre le diamètre de l'IDR et le pourcentage de transformation lymphoblastique à la tuberculine de l'OMS chez 28 témoins à IDR positive mesurée.*

de cellules transformées, en dehors de 2 cas à 20 et 30 %, la plus grande majorité des sujets n'ont eu que de 0 à 5 % de transformation lymphoblastique.

Le calcul du test de Spearman n'a pas apporté de surprise : 0,23 prouvant bien l'absence de lien entre ces deux paramètres.

EN CONCLUSION, il apparaît que :

1) Dans le groupe de sujets sains à IDR positive, les TTL sont légèrement plus positifs que dans le groupe des sujets à IDR négative.

2) Il ne semble pas y avoir de corrélation entre le diamètre de l'IDR et le pourcentage de transformation lymphoblastique, du moins pour les faibles concentrations de tuberculine utilisées.

III. GROUPE DE 31 TUBERCULEUX A IDR POSITIVE

1° *La répartition des pourcentages de transformation lymphoblastique à la PHA* permettait de vérifier pour ce groupe, comme pour les précédents, la bonne viabilité des lymphocytes étudiés (entre 80 et 100 % de cellules transformées).

2° *Répartition des pourcentages de transformation lymphoblastique à la tuberculine de l'OMS* (Fig. 9).

Nous avons obtenu 29 TTL positifs, ce qui donne un pourcentage de 93 %.

Par rapport aux sujets témoins, nous avons constaté, non seulement un nombre plus important de TTL positifs, mais aussi

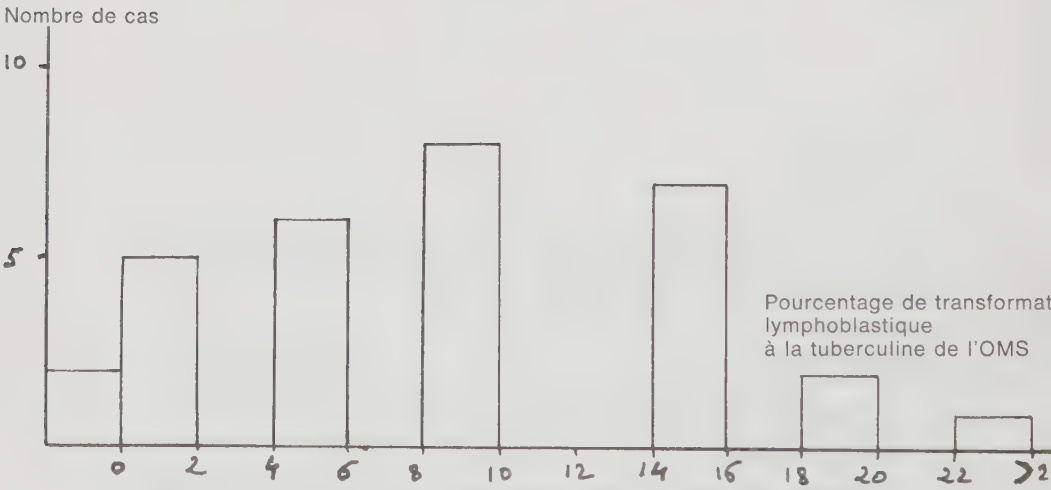

Figure 9. — *Répartition des pourcentages de transformation lymphoblastique à la tuberculine de l'OMS chez 31 tuberculeux à IDR positive.*

parmi ces derniers des pourcentages beaucoup plus élevés de transformation : le plus grand nombre de résultats se situant, par ordre décroissant, entre 8 et 10 % puis entre 4 et 6 %, et 14 et 16 %.

Nous avons remarqué, une fois de plus, en dehors de tout autre facteur, l'influence de l'âge, sur la réponse au TTL : les 2 TTL négatifs se trouvent dans un groupe de 15 adultes, tandis que les 19 enfants que nous avions ont eu un TTL positif.

La valeur moyenne de réponse au TTL, en pourcentage de cellules transformées, pour un adulte jeune et pour un enfant est cependant peu différente : 8,1 % pour un adulte, 10,2 % pour un enfant. La valeur moyenne générale est de 10 %.

3° *Répartition des diamètres de l'IDR* (Fig. 10).

Chez 20 tuberculeux, nous avons pu faire une IDR et en mesurer le diamètre. Le plus grand nombre de diamètres se situe entre 15 et 20 mm, puis entre 5 et 10 mm.

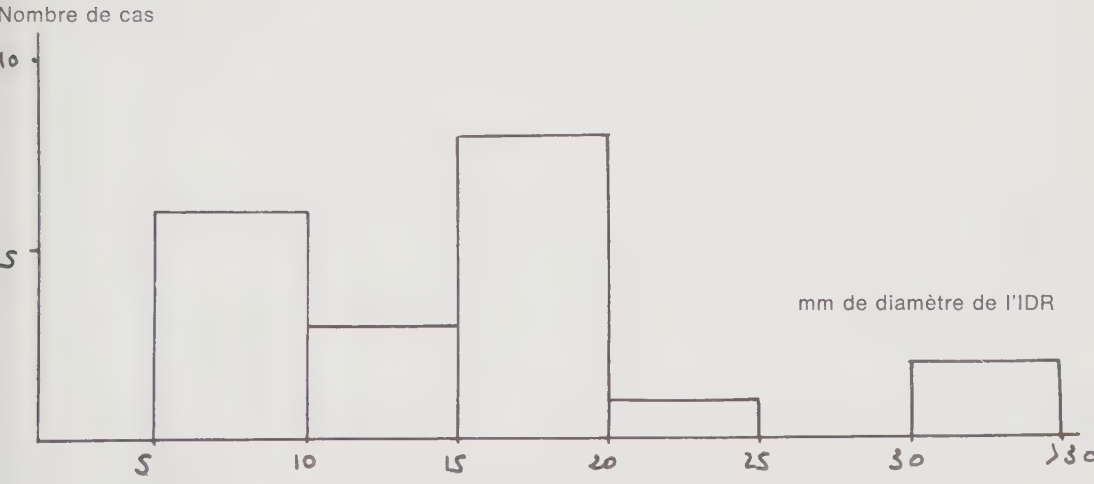

Figure 10. — *Répartition des diamètres de l'IDR chez 20 tuberculeux à IDR positive mesurée.*

4° *Influence de la concentration de la tuberculine.*

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la concentration la plus élevée de tuberculine, c'est-à-dire avec 50 unités quand cette

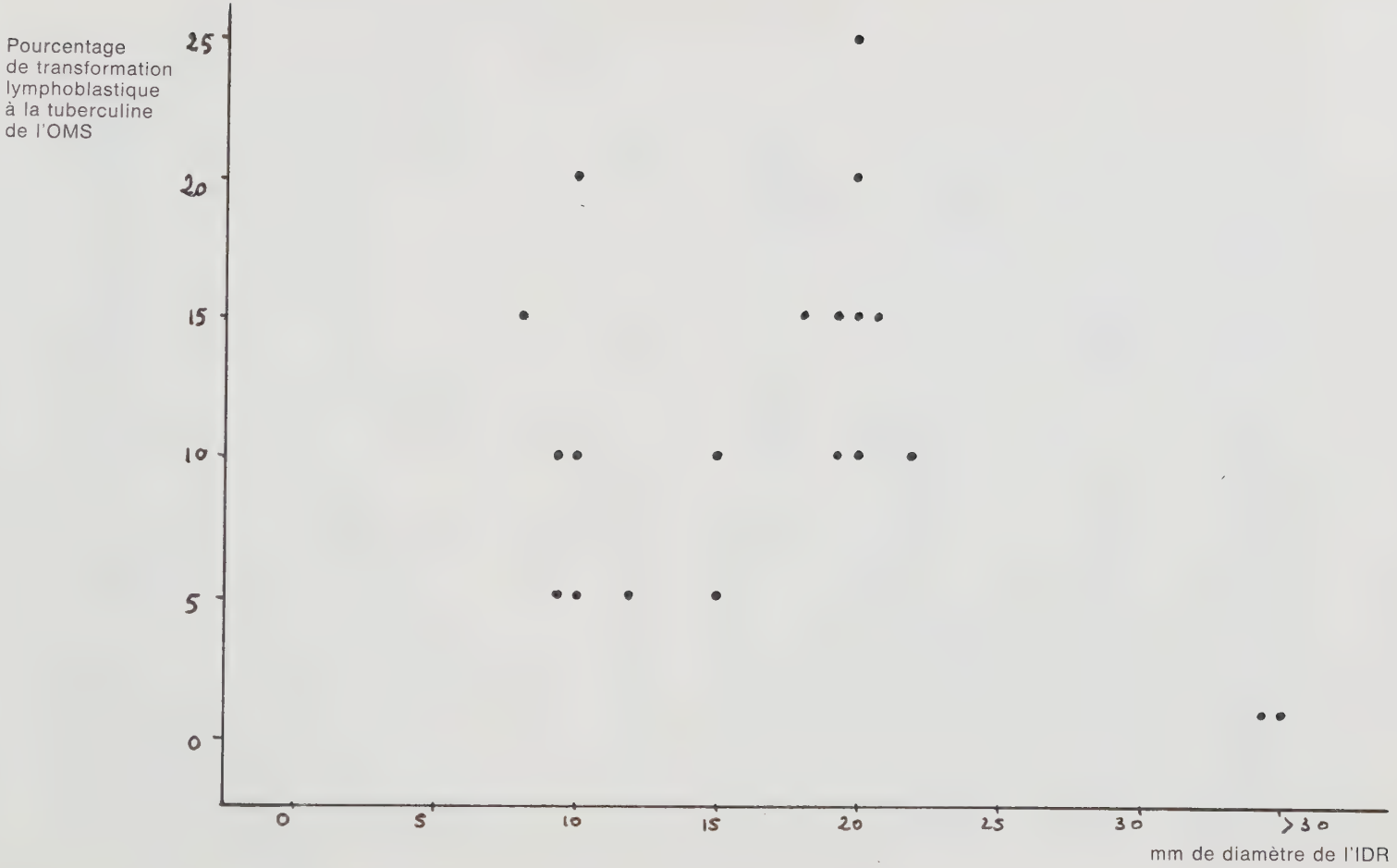

Figure 11. — *Corrélation entre le diamètre de l'IDR et le pourcentage de transformation lymphoblastique à la tuberculine de l'OMS chez 20 tuberculeux à IDR positive mesurée.*

concentration a été faite, ou avec 30 unités dans les cas où le test n'a pas été fait avec 50 unités de tuberculine.

5° *Comparaison entre le diamètre de l'IDR et le pourcentage de transformation lymphoblastique à la tuberculine de l'OMS* (Fig. 11).

Il n'est pas apparu de lien entre ces deux paramètres et le calcul du test de Spearman a été sans signification : 0,19.

6° *Comparaison entre le type de l'IDR et le pourcentage de transformation lymphoblastique à la tuberculine de l'OMS* (Fig. 12).

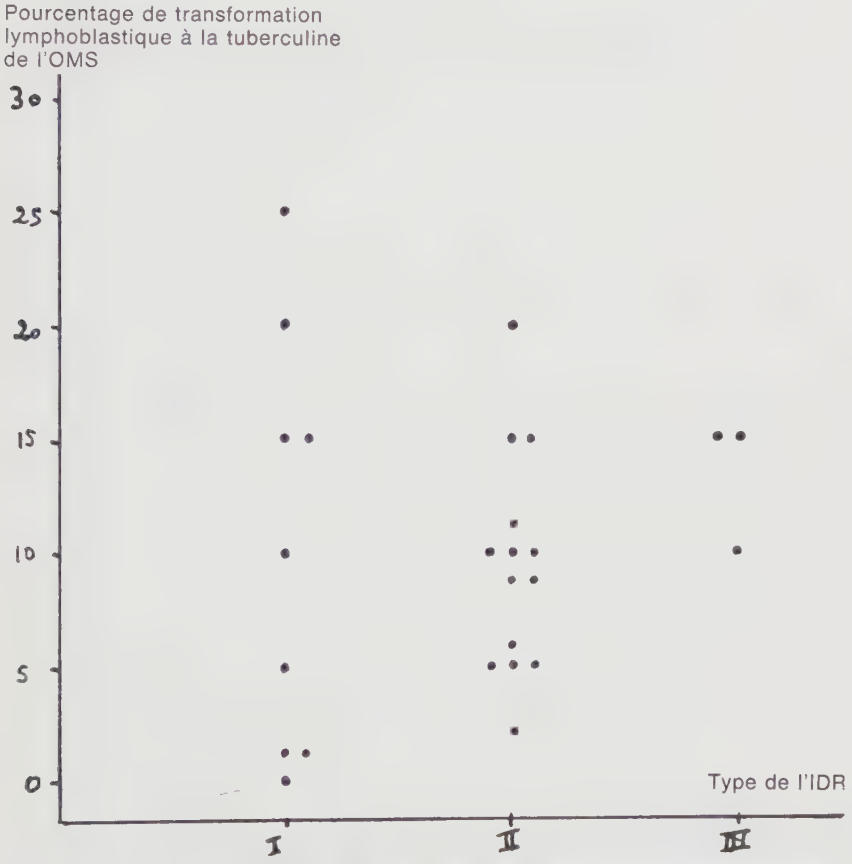

Figure 12. — *Corrélation entre le type de l'IDR et le pourcentage de transformation lymphoblastique à la tuberculine de l'OMS chez 26 tuberculeux à IDR positive mesurée.*

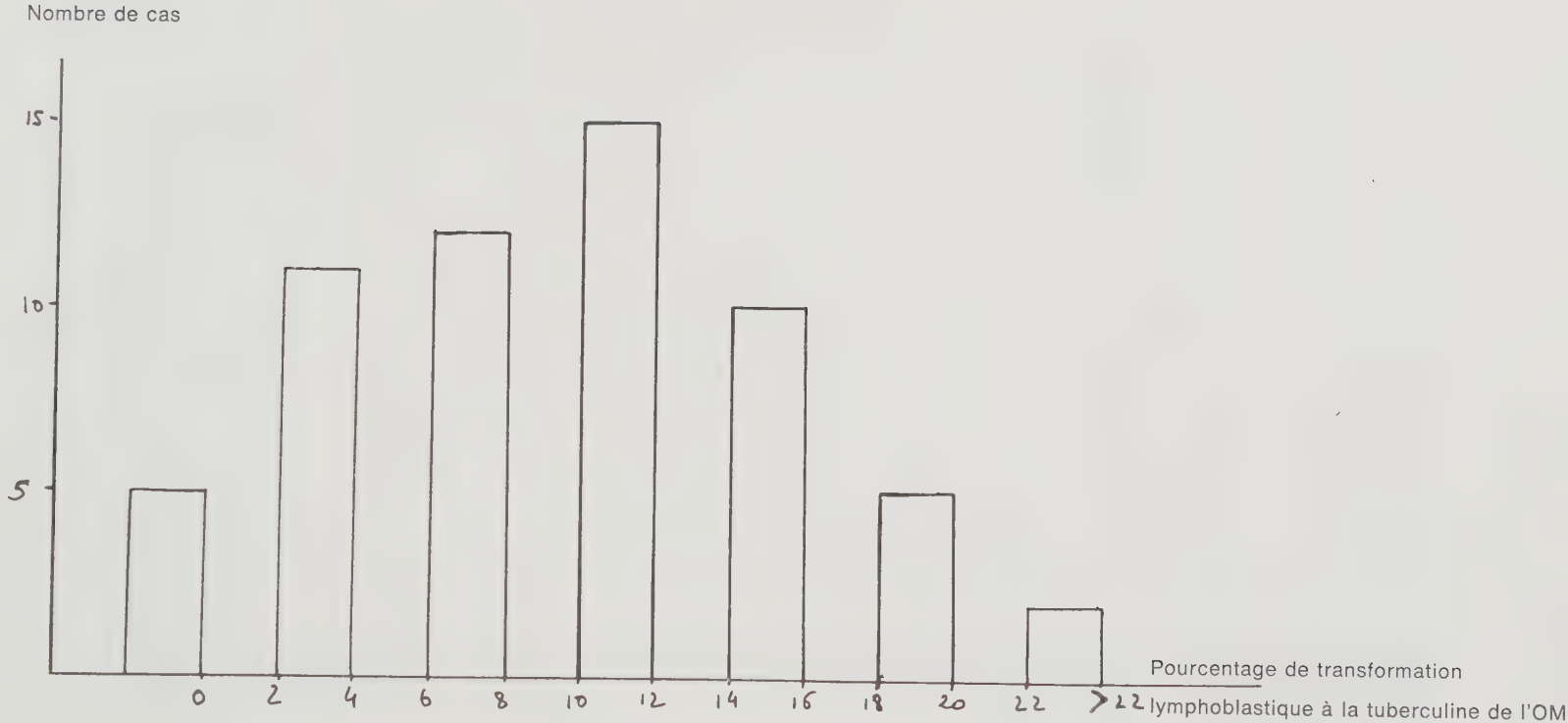

Figure 13. — *Répartition des pourcentages de transformation lymphoblastique à la tuberculine de l'OMS chez 60 tuberculeux.*

Connaissant le type de l'IDR de 26 tuberculeux, nous l'avons comparé au pourcentage de transformation lymphoblastique obtenu chez ces malades. Le résultat s'avère sans signification, le test de Spearman a été de 0,12.

EN CONCLUSION, il apparaît que :

1) dans ce groupe de malades tuberculeux, les TTL sont à la fois plus souvent et plus nettement positifs que dans le groupe de sujets non tuberculeux à IDR positive, avec une moyenne générale de transformation lymphoblastique de 10 %.

2) Comme dans le groupe précédent, il ne semble pas y avoir de corrélation entre le diamètre de l'IDR et le pourcentage de transformation lymphoblastique.

IV. GROUPE DE MALADES TUBERCULEUX SANS IDR

En ne tenant pas compte de leur IDR, nous avons fait le TTL de 60 malades (Fig. 13).

Le résultat obtenu est tout à fait comparable à celui des tuberculeux à IDR positive, les pourcentages de transformation les plus élevés se situent autour des mêmes chiffres (*cf.* fig. 9).

B. — EXPERIENCES REALISEES AVEC LA TUBERCULINE IP 48 ET L'ANTIGENE DE MIDDLEBROOK

Nous avons fait ces expériences sur un groupe hétérogène de 28 malades tuberculeux, dont 17 avaient une IDR positive, 2 une IDR négative, l'IDR des 9 derniers n'étant pas connue.

1° *Répartition des pourcentages de transformation lymphoblastique à la tuberculine* IP 48 (Fig. 14).

Nous avons eu 22 TTL positifs ; les 2 tuberculeux à IDR négative ont eu des TTL négatifs. Le plus grand nombre de pourcentages d'induction positifs se situe entre 0 et 4 % de cellules transformées.

La tuberculine IP 48 a été utilisée avec 4 concentrations différentes : 20, 50, 70 et 100 unités ; pour chaque malade, on a consigné ici le meilleur résultat, obtenu généralement avec la plus forte concentration de tuberculine.

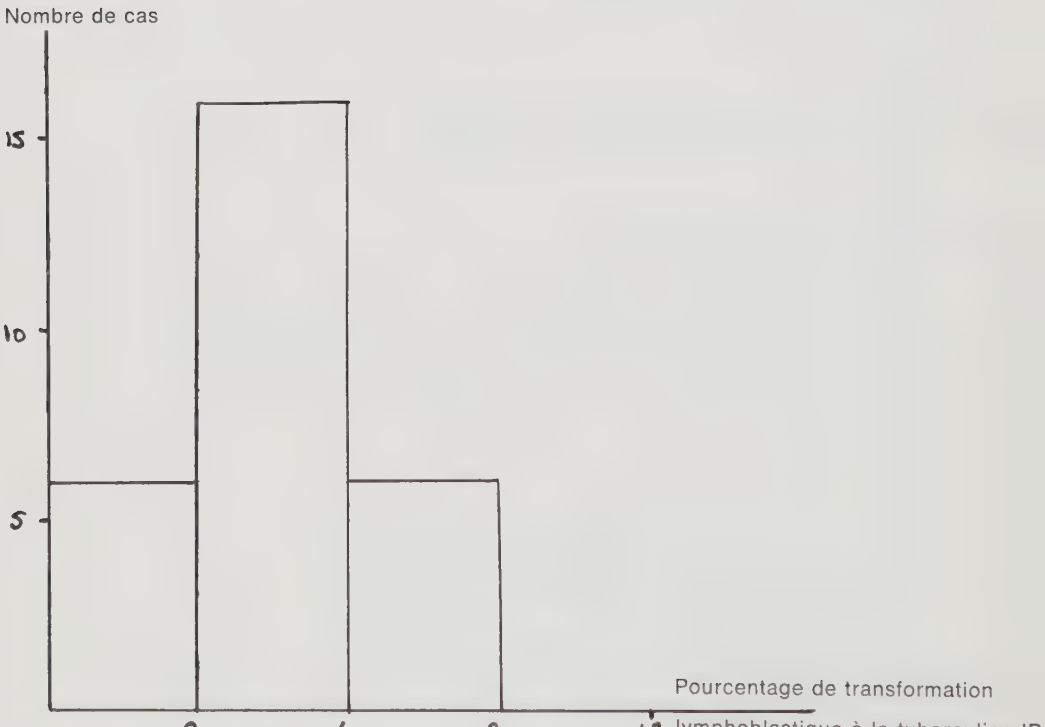

Figure 14. — *Répartition des pourcentages de transformation lymphoblastique à la tuberculine IP 48 chez 28 tuberculeux.*

2° *Répartition des pourcentages de transformation lymphoblastique à l'antigène de Middlebrook* (Fig. 15).

Nous avons eu seulement I3 TTL positifs, soit 46 %. L'antigène de Middlebrook a été utilisée avec 2 concentrations différentes : 14 mcg et 1,4 mcg. Le plus souvent, les pourcentages de transformation ont été obtenus avec 14 mcg.

Comme pour la tuberculine IP 48, le plus grand nombre de pourcentages d'induction positifs se situe entre 0 et 4 % de cellules transformées.

3° *Corrélation entre le TTL à la tuberculine* IP 48 *et le TTL à l'antigène de Middlebrook* (Fig. 16).

Il n'est pas apparu de corrélation entre ces 2 tests ; le test de Spearman est égal à 0,24.

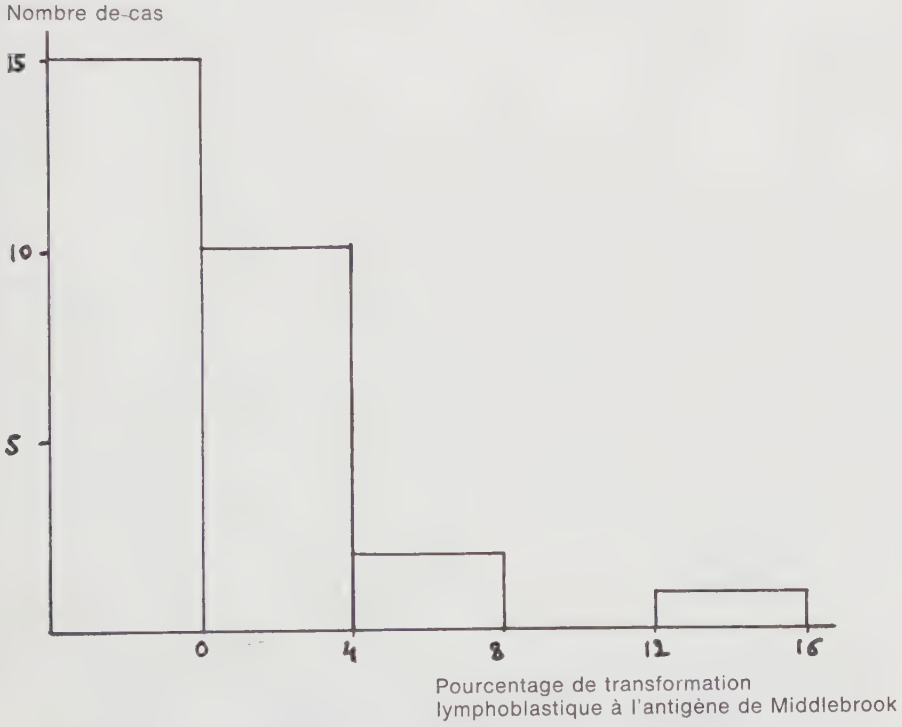

Figure 15. — *Répartition des pourcentages de transformation lymphoblastique à l'antigène de Middlebrook chez 28 tuberculeux.*

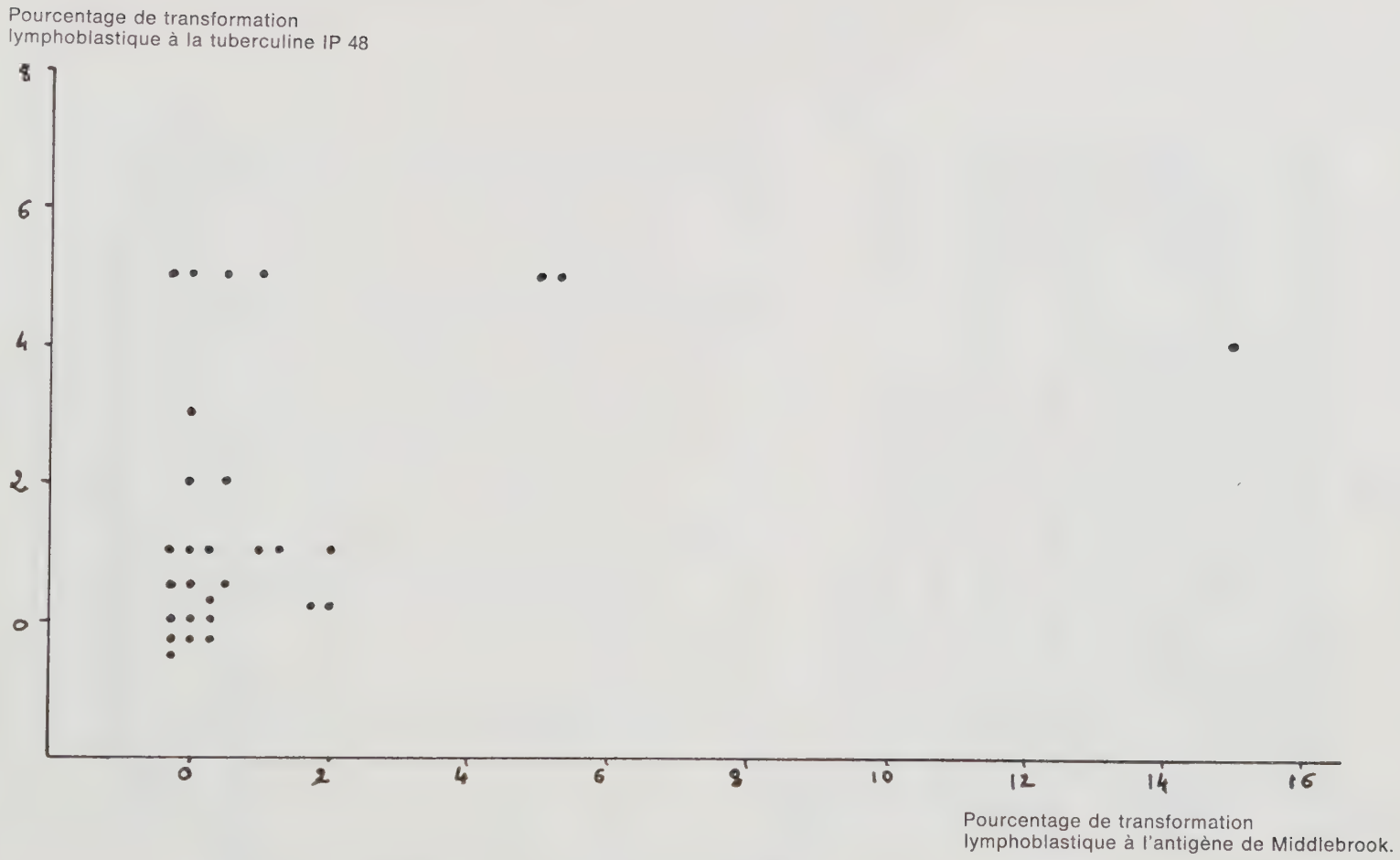

Figure 16. — *Corrélation entre le TTL à la tuberculine IP 48 et le TTL à l'antigène de Middlebrook dans un groupe de 28 tuberculeux.*

C. — COMPARAISON DE RESULTATS DE TTL A LA TUBERCULINE IP 48 ET DE RESULTATS DE TTL A LA TUBERCULINE DE L'OMS CHEZ DES MALADES TUBERCULEUX A IDR POSITIVE THEORIQUEMENT COMPARABLES (Fig. 17)

Il apparaît qu'avec la tuberculine de l'OMS, on a un pourcentage d'induction qualitativement et quantitativement plus important qu'avec la tuberculine IP 48.

Nous reviendrons sur ce point important dans la discussion.

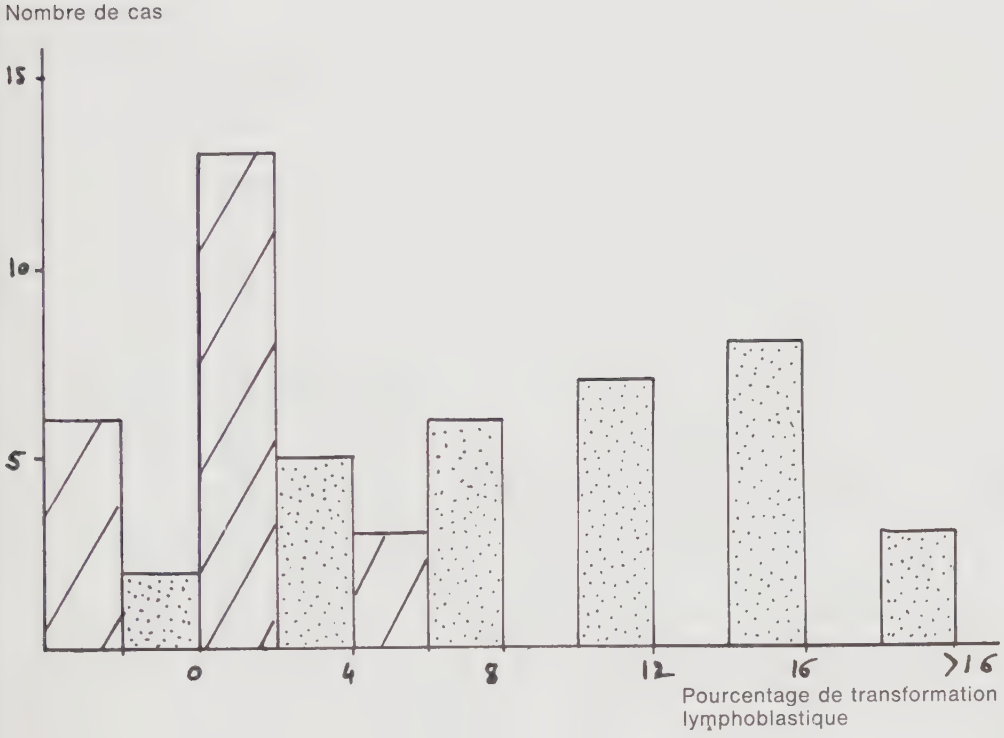

Figure 17. — *Comparaison de la valeur du TTL chez des malades tuberculeux à IDR positive, théoriquemént comparables :*

a) *pour un groupe de 31 malades, on a employé de la tuberculine de l'OMS* (en pointillé) ;

b) *pour un groupe de 22 malades, on a employé de la tuberculine IP 48.*

D. — TTL ET CULTURE DE BK
TTL ET DIAGNOSTIC CLINIQUE

1° *Culture de BK.*

Chez 20 malades tuberculeux, la culture de BK a été positive pour 15 d'entre eux, et négative pour les 5 autres ; dans ces deux groupes, la valeur moyenne du pourcentage de transformation lymphoblastique pour un malade est de 11,2 % pour les malades BK négative, et de 9,8 % pour les BK positive.

Nous n'avons pas un nombre assez grand de sujets pour nous permettre de tirer des conclusions ; nous pouvons simplement penser qu'à première vue, il n'y aurait pas de différence significative dans la réponse au TTL des tuberculeux, qu'ils aient ou non des cultures positives au BK. Il faut noter que tous ces malades étaient à des stades très divers de leur maladie et qu'au moment des tests, ils étaient tous sous antibiothérapie.

2° *Différence de pourcentage de transformation lymphoblastique entre les malades avec primo-infection et les malades avec tuberculose pulmonaire.*

8 enfants avaient un diagnostic de primo-infection ; la valeur moyenne de réponse au TTL en pourcentage de cellules transformées a été supérieure chez ces enfants à celle des malades avec tuberculose pulmonaire : 10,3 % pour 9,2 % chez ces derniers.

Peut-on expliquer cette différence par la différence de diagnostic clinique, ou plus simplement parce que les sujets ayant une primo-infection étaient des enfants ?

EN CONCLUSION

Il nous paraît important de souligner les points suivants :

1. Dans tous nos groupes, plus on augmente la concentration de tuberculine, plus le taux de positivité est élevé.

2. L'influence de l'âge n'est pas négligeable. Les sujets jeunes ont des pourcentages d'induction plus élevés que les sujets âgés.

3. L'influence de la nature de la tuberculine est aussi un facteur à ne pas négliger.

4. La différence de réponse au TTL n'est pas très importante entre les sujets sains à IDR négative et les sujets sains à IDR positive. Elle est, par contre, très significative entre tous les sujets sains et les malades tuberculeux.

DISCUSSION

Elle portera sur trois points :

— les techniques utilisées,

— l'interprétation des tests,

— une revue des résultats obtenus par d'autres auteurs.

A. TECHNIQUES

Nous avons recherché dans la littérature les techniques de culture des lymphocytes employées dans les TTL à la tuberculine. Une même chronologie dans le déroulement des différentes phases a été respectée par la plupart des auteurs.

— Après prélèvement aseptique d'une quantité variable de sang, certains auteurs utilisent ce sang total, ou bien, par diverses méthodes, cherchent à obtenir des lymphocytes purifiés.

— La sédimentation et la centrifugation du sang, ou bien l'une ou l'autre de ces opérations constituent l'étape suivante permettant d'éliminer les globules rouges du plasma.

— L'adjonction d'un milieu de culture et de l'antigène intéressé vient ensuite.

— Après une attente de quelques jours, l'étape terminale consiste, après étalement sur lame et coloration, à faire la lecture des résultats.

Nous avons, d'autre part, relevé 8 méthodes de culture de lymphocytes, bien individualisées, qui ont été appliquées par un certain nombre d'auteurs :

— La méthode de MOORHEAD (36) en 1960, qui fut modifiée par LYCETTE, PEARMAIN et FITZGERALD (31) en 1962.

— BRANDT (3), QUAGLINO, HAYHOE et FLEMANS (40) en 1962.

— En 1964 : BACH et HIRSCHHORN (2).

— En 1965 : HUNGERFORD (24).

— En 1966 : CARON (4).

— En 1967 : La méthode mise au point par HALPERN, KY et AMACHE est celle la plus souvent employée en France maintenant ; elle est d'ailleurs réalisée d'après la méthode de BRANDT.

A la lumière de ces différentes techniques, et d'autres plus personnelles que nous avons relevées dans notre revue de la littérature, nous avons cherché à analyser les différentes étapes de la culture des lymphocytes.

1. PRELEVEMENT, QUANTITE ET ANTICOAGULANT

HALPERN, KY et AMACHE (15) font un prélèvement de 60 ml ou de 30 ml de sang, tandis que HUNGERFORD (24) préconise une méthode de culture à partir d'un prélèvement de 0,8 ml. Chez les enfants, en particulier, la possibilité de faire un aussi faible prélèvement est très intéressante.

Le plus souvent, les auteurs font des prélèvements de 10 ml (1), (7), (41), (5), (4)...

L'anticoagulant : l'héparine a été utilisée dans la plupart des cas ; CARON et SARKANY (7) emploient l'héparine-lithium. HALPERN préfère l'héparinate de calcium ; il pense que l'héparine, un peu acide, risque de lyser les cellules.

Certains utilisent un matériel siliconé (28).

2. SANG TOTAL OU LYMPHOCYTES PURIFIES ?

Rappelons quelques techniques utilisées pour obtenir des lymphocytes purifiés : HALPERN d'après la technique de BRANDT (3) filtre le sang à travers une colonne de laine de verre qui retient les polynucléaires.

SCHREK (45), après passage du sang sur colonne de laine de verre siliconée dit obtenir une suspension de 90 à 97 % de lymphocytes, les polynucléaires et les monocytes ayant été enlevés.

WALFORD (52), après passage du sang à travers un disque comprimé de fibres de nylon stérile lavé, enlève la majorité des polynucléaires du sang.

Dans notre laboratoire, nous passons maintenant le sang sur une colonne de coton hydrophile.

L'expérience montre que l'utilisation des lymphocytes purifiés présente certains avantages : grâce à une quantité de sang plus faible, les manipulations sont plus simples, la lecture des résultats plus rapide.

Que penser de l'emploi du sang total ? Il expose à certaines difficultés :

— La dilution des lymphocytes et leur petit nombre relatif entraîne un comptage plus laborieux.

— La présence des autres cellules sanguines, polynucléaires, monocytes, a des inconvénients : les polynucléaires se lysent spontanément après 72 heures de culture. Plus gênante est la survie des monocytes.

En fait, ces deux méthodes gardent le même inconvénient : la présence des monocytes. Ces derniers, par leurs caractères morphologiques, sont parfois difficiles à différencier des grandes cellules blastiques. Or, même les cultures de lymphocytes purifiés en contiennent parfois un certain pourcentage.

De plus, en confrontant les résultats obtenus par les partisans de l'une ou l'autre méthode, nous n'avons pas observé de différence significative.

3. MILIEUX DE CULTURE ET DUREE DE LA CULTURE

Les milieux de culture sont variés. Mais, quels que soient leurs composants, ils comportent tous des antibiotiques, le plus souvent de la pénicilline et de la streptomycine.

Quatre principaux milieux de culture ont été utilisés, les auteurs y apportant le plus souvent quelques modifications.

1° *Le milieu essentiel minimum de Eagle.*

Pour Bach et Hirschhorn (2) : 80 % des lymphocytes dans 3,5 ml de MEM sont complétés par du sérum de veau fœtal, de la L. glutamine et des antibiotiques.

Pour un volume total de 5 ml, au MEM de Eagle, Gump et ses collaborateurs (14) ajoutent :

1ml de sérum de veau agammaglobulinémique,

10 micromoles de L. glutamine,

500 unités de pénicilline,

500 mcg de streptomycine.

H. C. Rauch (42) utilise du MEM Spinner comprenant des antimicrobiens et 30 % de sérum de veau (Gibco).

Le milieu de Hungerford se compose des éléments suivants :

— des acides aminés indispensables de Eagle et des vitamines à une double concentration qui, dans une solution salée équilibrée, ajustée au pH 7 avec 7,5 % de Na H CO_3, sont complétés comme suit :

2 millimoles de glutamine,

100 unités/ml de pénicilline,

100 mcg/ml de streptomycine,

7 mcg/ml de rouge de phénol.

Du sérum de bovin agammaglobulinémique foetal ou nouveau-né est aussi ajouté pour faire respectivement 15 % et 2 % du volume final, et on termine enfin par 20 000 (USP) d'héparinate de sodium par litre du milieu complété.

2° *Le milieu TC* 109 (*Difco*).

Après sédimentation et centrifugation du sang prélevé, HEILMAN et MCFARLAND (20-21) obtiennent 1 700 cellules par mm^3 de milieu auquel ils additionnent 100 mcg/ml de streptomycine et 100 u. de pénicilline.

3° *Le milieu TC* 199 (*Difco*).

Ce milieu a été mis au point par MORGAN (37) en 1950. Il se prépare avec un pourcentage constant d'antibiotiques :

200 unités/ml de pénicilline,

100 mcg/ml de streptomycine.

CARON (7) l'utilise avec 25 % de plasma.

KERBY (26) et MOORHEAD (36) avec 30 à 40 % de plasma autologue ou homologue.

SCHREK (45), enfin, en part égale avec le sérum.

4° *Le milieu* 199 *de Parker.*

En Suède, ASPEGREN et RORSMAN (1) utilisent ce milieu avec le pourcentage suivant :

70 % de milieu,

30 % de plasma.

En France, comme le fait HALPERN, la plupart des expérimentateurs emploient le milieu 199 de Parker de l'Institut Pasteur, comportant :

70 % de milieu de Parker 199,

30 % de plasma autologue,

100 unités/ml de pénicilline,

ou 150 mcg/ml de streptomycine.

Nous avons relevé des temps de culture très variés allant de quelques heures à 7 à 8 jours. Dans notre revue de la littérature, nous n'avons donné que des résultats lus après 3 ou 4 jours de culture, car les polynucléaires sont lysés, et après ce temps-là, il

n'apparaît généralement plus de transformation lymphoblastique. Tous les auteurs suggèrent ce laps de temps comme le meilleur.

Caron (5), cependant, a montré qu'avec une concentration optimum de PPD, l'exposition des lymphocytes humains d'un sujet sensible à la tuberculine pendant moins de 10 secondes, était suffisante pour induire une transformation lymphoblastique mesurée 6 jours plus tard.

4. ANTIGENES

C'est la partie la plus importante de notre discussion. Quelles sont les substances extraites du bacille de Koch qui ont été utilisées, et à quelles concentrations ?

Nous avons relevé 4 tuberculines de nature différente, utilisées par les auteurs :

— la vieille tuberculine ou tuberculine brute,
— la tuberculine PPD,
— la tuberculine PPD-S,
— une tuberculoprotéine.

a) *La vieille tuberculine ou tuberculine brute.*

Rappelons que l'on appelle « vieille tuberculine », une tuberculine préparée à partir de cultures en voiles, âgées de six semaines, sur bouillon de veau glycériné. La stérilisation est faite à 120° C ou 100° C pendant 30 minutes, et la concentration par évaporation à 100° C permet une réduction au dixième du volume primitif. Après filtration sur papier, le filtrat obtenu est un liquide sirupeux brunâtre qu'on emploie tel quel pour les cuti-réactions ou dilué pour les intradermo-réactions.

Une tuberculine de ce type est conservée à Copenhague, comme étalon international. Par définition, 1 cm^3 de cet étalon contient 100 000 unités tuberculiniques.

Les auteurs qui ont utilisé la tuberculine brute n'ont en général examiné qu'un nombre restreint de sujets. De plus, certains ne précisent pas avec toute la rigueur souhaitable la quantité de tuberculine utilisée dans les TTL.

Ainsi, COWLING (9) utilise une dilution du « 1/4 000 » qu'il juge la plus adaptée à un taux optimum de transformation lymphoblastique. Son étude qui porte sur 8 sujets lui donne un taux de corrélation totale entre tests cutanés positifs et négatifs d'une part, et présence de cellules transformées et de mitoses ou absence de ces mêmes cellules d'autre part. Il faut encore noter au sujet de cette publication que l'auteur obtient des résultats plus faciles à interpréter en comptant le pourcentage des cellules blastiques qu'en tenant compte uniquement du nombre des mitoses.

Pour d'autres, tel ASPEGREN (1), la corrélation entre positivité des pourcentages lymphoblastiques et des IDR est moins parfaite. Pour 20 sujets sensibles à la tuberculine, il n'a, en effet, observé que 14 TTL positifs, tandis que sur 10 sujets non sensibles à la tuberculine, 4 avaient des TTL positifs. Il faut noter cependant que cet auteur n'a tenu compte dans l'appréciation du taux de positivité des lymphocytes que des mitoses observées.

MATSIANOTIS (34) dispose d'un échantillonnage de tests plus importants composés de 100 enfants non sensibles à la tuberculine. Parmi ceux-là, 23 ont eu des TTL positifs. Sur les 9 sujets sensibles testés, 8 présentaient des transformations lymphoblastiques de leurs lymphocytes. Il faut noter qu'ici encore cet auteur ne tient compte pour apprécier la positivité des tests que de la présence ou absence de mitoses.

Plus récemment, LEWI (29) présente des résultats portant sur un échantillonnage important de 208 sujets. Il conclut à l'existence d'un parallélisme net entre l'existence de tests cutanés et lymphocytaires, tout au moins dans les cas d'allergie tuberculinique cutanée indiscutable.

Il ressort néanmoins de l'observation de ses résultats spécialement pour les sujets ayant une allergie cutanée faible qu'il n'existe

aucune corrélation statistique significative entre le nombre de lymphocytes transformés et le diamètre de l'infiltrat dermique. Pour ces mêmes cas, il note encore des écarts fréquents dans les deux sens, dont l'interprétation paraît malaisée.

Les résultats de cet auteur appellent deux remarques :

— il a utilisé la dose élevée de 200 unités de tuberculine par ml de culture ;

— il s'adresse à une population bien particulière de sujets âgés dont la moyenne d'âge est de 80 ans.

La conclusion de cet auteur est que les deux modes d'exploration sont complémentaires en dépit de résultats parfois discordants.

b) *La PPD, dérivé de protéine purifiée de tuberculine.*

La tuberculine PPD de Florence Seibert (1934) est préparée par ultrafiltration, puis précipitation trichloracétique ; c'est le procédé employé pour la PPD de Copenhague. Les PPD contiennent des lipides et des polysaccharides. Cette tuberculine est la plus utilisée par les Anglo-Saxons.

Caron (5) a voulu prouver que le degré de transformation lymphoblastique obtenu avec la PPD chez un donneur sensible à la tuberculine, dépendait de la dose utilisée. Avec des concentrations de 0,025, 0,05, 0,625, 1,25 et 2,5 mcg/ml, il a montré que la transformation est maximum pour une concentration de 1,25 mcg, ce qui correspond à 62,5 unités de tuberculine.

Or, en fait, tous les auteurs que nous avons consultés ont utilisé des doses beaucoup plus importantes, avec des résultats apparemment aussi satisfaisants.

En utilisant 2,5 mcg/ml de PPD, Hirschhorn (23) et Smithwick (49) ont cultivé les lymphocytes de sujets atteints de tuberculose pulmonaire active. Tous leurs malades ont eu un test de transformation lymphoblastique positif. Chez 2 malades, Hirschhorn trouve respectivement 34 % et 28 % de cellules

blastiques et de mitoses. Les lymphocytes des 6 enfants observés par SMITHWICK ont une valeur moyenne de pourcentage de cellules transformées de 11,7 %.

Par contre, avec une dose beaucoup plus importante de PPD : 10 mcg/ml, PEARMAIN n'a trouvé aucune mitose chez ses tuberculeux. Cependant, avec la même dose de PPD, il a observé une parfaite corrélation entre la sensibilité cutanée à la tuberculine et le test *in vitro* chez 12 donneurs sains sensibles à la tuberculine et chez 5 sujets non sensibles à la tuberculine, sauf un.

Il faut noter cependant qu'à l'inverse des précédents, cet auteur n'a tenu compte dans l'appréciation des tests que de la présence ou de l'absence de mitoses.

SCHREK a observé des transformations lymphoblastiques chez les lymphocytes de sujets dont il ignorait l'état de sensibilité cutanée ; ces transformations lymphoblastiques ont été uniquement appréciées par l'absence ou la présence de mitoses. SCHREK est un des premiers expérimentateurs du TTL.

c) *La PPD-S : tuberculine PPD de Seibert.*

La PPD-S de Florence Seibert [1941] (46) est préparée par ultra-filtration, suivie de précipitation par le sulfate d'ammonium à neutralité ; cette PPD-S plus pure que la PPD, et conservée par lyophilisation, sert également de témoin international ; 0,02 mcg/ml de cette tuberculine desséchée contient une unité internationale.

HEILMAN (20) a utilisé cette tuberculine. Chez 6 sujets en bonne santé, sensibles à la tuberculine, il a obtenu avec 10 mcg/ml des résultats satisfaisants : 4 sujets avaient chacun environ 20 % de cellules transformées, le cinquième : 5,7 % et le sixième : 62,5 %. Il a aussi comparé l'activité de transformation lymphoblastique de PPD-S avec celle de tuberculosaccharides : polysaccharide I : fraction 107 IV, préparée à partir d'un filtrat de culture non chauffé de Mycobactérium Tuberculosis H 37 Ra qui contenait 12,8 % de protéine et 87,1 % de polysaccharide I [SEIBERT (47)]

et polysaccharide II : fraction 85 à gros poids moléculaire préparée à partir d'une culture non chauffée d'une race bovine de Mycobactérium Tuberculosis [SEIBERT (48)]

Or, chez les mêmes sujets testés avec PPD-S, en faisant des expériences avec des doses de 40 mcg/ml de polysaccharides I et II, les résultats ont été presque négligeables ; pour ne citer qu'un exemple, un sujet sensible à la tuberculine avait 25,4 % de transformation lymphoblastique avec PPD-S, 0,4 % avec polysaccharide I et 0 % avec polysaccharide II.

Lors d'une autre expérience, HEILMAN et McFARLAND (32) en utilisant cette fois 500 mcg/ml de PPD-S sur les lymphocytes de sujets à IDR positive et à IDR négative ont obtenu des résultats comparables à ceux qu'ils avaient obtenu avec 10 mcg/ml de PPD-S.

d) *Tuberculoprotéine de Rauch* (42).

RAUCH (42) a utilisé une tuberculoprotéine dont la préparation est la suivante : on fait pousser Mycobactérium Tuberculosis H 37 Ra sur milieu de Sauton pendant 3 mois. Le filtrat de culture est précipité par saturation avec le sulfate d'ammonium à froid. Le précipité est redissous dans l'eau distillée, dialysé et lyophilisé. Avec un tel antigène, il a observé des mitoses chez les lymphocytes de 60 % des sujets vaccinés par le BCG et 60 % aussi chez les malades tuberculeux. Il faut noter cependant que les pourcentages obtenus sont peu élevés, aux environs de 0,5 %.

ROLE DU PLASMA

HEILMAN et McFARLAND (21) ont une fois encore utilisé 10 mcg/ml de PPD-S et avec 2 sujets non tuberculeux sensibles à la tuberculine, ils ont eu de bons résultats : 16,5 % et 5,6 % de cellules transformées ; avec 2 sujets atteints de tuberculose pulmonaire aiguë, les pourcentages étaient beaucoup plus faibles : 0,9 % et 3,3 %. Ceci leur a suggéré l'idée d'une influence possible du

plasma sur l'action blastogénique et mitogénique de la tuberculine. Pour le démontrer, ils ont ajouté aux lymphocytes d'un donneur, le plasma d'un autre donneur, et ils sont arrivés à la conclusion que le sérum ou le plasma tuberculeux diminuerait l'action mitogénique de la tuberculine sur les lymphocytes d'un donneur en bonne santé.

Ainsi, chez un sujet sensible à la tuberculine, dont les lymphocytes sont cultivés dans un plasma autologue, on obtient 16,5 % de transformation lymphoblastique. Si, chez ce même sujet, on remplace ce plasma par le plasma d'un sujet tuberculeux, on n'obtient plus que 5,6 % de transformation lymphoblastique. A l'inverse, les lymphocytes d'un sujet tuberculeux cultivés avec le plasma autologue ne montrent que 0,9 % de transformation lymphoblastique ; quand on remplace leur plasma par le plasma d'un sujet sain, on obtient 4,1 % de transformation.

Caron et Sarkany (7) ont fait des expériences analogues, mais en utilisant de la vieille tuberculine. Avec 2 sujets sensibles à la tuberculine, et 2 autres non sensibles, ils ont démontré que la vieille tuberculine induisait la transformation lymphoblastique des lymphocytes d'un donneur immunisé en l'absence du plasma autologue ; ils ont aussi mis en évidence que le plasma d'un individu immunisé ne conférait pas la possibilité d'une transformation *in vitro* en présence de l'antigène aux lymphocytes d'un individu non immunisé. Cette découverte est en accord avec la possibilité de transférer la sensibilité tuberculinique de type retardé *in vivo* avec des suspensions de lymphocytes et non avec le plasma.

Dans le sens de l'observation de Heilman et McFarland, des auteurs allemands Wuttke et ses collaborateurs (53) ayant fait des expériences avec 32 malades tuberculeux en ont aussi déduit qu'il devait exister un facteur dans le plasma des malades tuberculeux, qui inhibe la transformation blastique des lymphocytes dans les cultures de cellules après addition de tuberculine. Ce facteur apparaît le plus actif dans le plasma des donneurs avec tuberculose active. Mais, ayant remarqué certains cas dans lesquels il y a inhibition de la transformation blastique, même si la culture se

compose de lymphocytes de donneur avec tuberculose active et de plasma de donneur non tuberculeux, les auteurs ont avancé la conclusion suivante : la réduction de la transformation blastique des lymphocytes est le fait de 2 facteurs : le plus important est la présence d'un facteur inhibiteur dans le plasma des malades tuberculeux, moins fréquemment la probabilité de la présence d'une déficience dans les lymphocytes de certains malades tuberculeux.

B. INTERPRETATION DU TEST

Après la stimulation par l'antigène auquel ils sont sensibilisés, les lymphocytes sont rapidement modifiés. Les premières expérimentations ne comptaient que les figures mitotiques qui apparaissent au deuxième et au troisième jour de la culture.

Maintenant, nous savons que les lymphocytes passent d'abord par un stade dit de « cellule intermédiaire », leur taille s'accroît, celle du noyau et du cytoplasme aussi, celui-ci tend à devenir basophile, un nucléole apparaît. Puis apparaissent les cellules blastiques : grandes cellules mononucléées de 20 à 30 µ de diamètre, pourvues d'un noyau volumineux avec plusieurs nucléoles, la chromatine est diffuse, le cytoplasme est abondant, fortement basophile ; il contient fréquemment de nombreuses vacuoles.

Formes dédifférenciées des lymphocytes, les figures mitotiques, les cellules intermédiaires et les cellules blastiques sont aujourd'hui comptées comme positives à la lecture des résultats.

Comme nous l'avons déjà fait remarquer plus haut, il ne faut pas oublier que la morphologie des monocytes offre quelques similitudes avec celle des cellules blastiques. Afin de ne pas les confondre, on se rappellera que ce sont des cellules de grande taille 25 à 30µ, au noyau volumineux, faiblement coloré, fait de filaments fins, au cytoplasme étendu présentant des granulations azurophiles très fines et nombreuses, avec parfois des vacuoles.

Une autre technique de lecture des résultats s'est ajoutée depuis quelques années à celle de l'observation microscopique de la

transformation lymphoblastique. L'incorporation dans les cultures de lymphocytes d'éléments marqués par le Tritium ou le C 14 : thymidine constituant des seuls acides désoxyribonucléique, ou uridine incorporée dans les molécules nouvelles d'acide ribonucléique, et la mesure de l'intensité de ces éléments au sein des cellules permet de déterminer leur degré d'activation par l'antigène.

C'est une méthode d'observation moins subjective, mais quant à la différenciation d'avec les monocytes, elle présente le même inconvénient, bien que la répartition des grains tout au moins en ce qui concerne l'uridine soit légèrement différente.

C. COMPARAISON DE NOS RESULTATS AVEC CEUX DE LA LITTERATURE

Afin d'avoir, sur les travaux des auteurs dont nous venons de parler, une vue d'ensemble, nous avons séparé en trois groupes différents les cas comparables. C'est pour cette raison que nous n'avons pas inclus les résultats de LEWI qui, par la quantité de tuberculine utilisée, et par l'âge moyen des sujets, étaient trop différents de l'ensemble des travaux des autres auteurs.

Comme dans notre propre observation, nous avons considéré 3 groupes de sujets :

a) Des sujets en bonne santé, sensibles à la tuberculine ;

b) Des sujets en bonne santé, non sensibles à la tuberculine ;

c) Des malades atteints de tuberculose pulmonaire active.

Pour simplifier ce travail, nous avons simplement compté les résultats positifs au Test de Transformation Lymphoblastique, qu'ils aient été exprimés en pourcentage de mitoses ou de cellules blastiques, et les résultats négatifs.

Nous avons ainsi pu rassembler :

77 cas de sujets sains sensibles à la tuberculine, dont 92 % avec un test de transformation lymphoblastique positif,

43 cas de sujets sains non sensibles à la tuberculine, dont 30 % avec un TTL positif,

et 94 malades tuberculeux, dont 45 % avec un TTL positif.

Nous rappelons nos propres résultats :

39 sujets sains avec IDR positive, 51 % ont un TTL positif,

27 sujets sains avec IDR négative, 26 % ont un TTL positif,

31 malades tuberculeux, 93 % ont un TTL positif.

1. LES SUJETS SAINS NON SENSIBLES A LA TUBERCULINE

Les résultats sont comparables : 30 % et 26 %.

2. LES SUJETS SAINS SENSIBLES A LA TUBERCULINE

Il y a une nette différence entre nos résultats et ceux des autres auteurs : 51 % et 92 %. Mais ceci est peut-être simplement dû au fait que, dans ce groupe de sujets, nous avons eu une proportion importante de personnes âgées qui ont eu très peu de TTL positifs. Cette hypothèse est cependant en contradiction avec celle de Lewi (29). Rappelons que cet auteur utilise de très fortes concentrations de tuberculine.

3. LES MALADES TUBERCULEUX

Par contre, il nous a paru intéressant de nous arrêter plus longuement sur le fait que nous avons obtenu 93 % de TTL positifs chez nos malades tuberculeux, alors que, dans l'ensemble des résultats des autres auteurs, ce pourcentage n'est que de 45 %.

Nous avons pensé que l'on pouvait peut-être expliquer le pourcentage élevé des TTL positifs trouvés chez nos malades par la conjonction de 2 facteurs :

— Des facteurs propres à nos malades,

— Des facteurs propres à notre technique.

A. *Des facteurs propres à nos malades :*

a) L'état clinique réel.

Nous avons trouvé couramment répandue dans la littérature l'opinion selon laquelle le manque de réactivité *in vitro* chez les malades tuberculeux serait dû à l'exposition continue des lymphocytes à la tuberculine, ce qui les rend incapables de lui répondre par une prolifération ultérieure. Or, nos malades ont tous été testés une fois le traitement antibiotique établi, ce traitement pouvant avoir éliminé l'imprégnation par les antigènes tuberculeux. Dans cette hypothèse, leur aptitude de réagir au TTL aurait une valeur pronostique favorable. Nous avons relevé dans la littérature quelques cas où les auteurs ont fait la différence entre des malades atteints de tuberculose active et des malades avec tuberculose stabilisée, Ricci (43), Pearmain (38), Matsianotis (34).

Les pourcentages de transformation lymphoblastique sont très nettement supérieurs chez les malades avec tuberculose stabilisée, et l'on peut assimiler ce genre de malades à nos tuberculeux traités, dont les défenses immunologiques sensibilisées s'expriment par la positivité du TTL. On peut alors considérer, chez les tuberculeux, la positivité ou la négativité du TTL comme un facteur de pronostic.

b) Le traitement.

D'autre part, des auteurs de Reims, Kochmann et ses collaborateurs (27), ont mis en évidence que le PAS (comme les corticoïdes) était susceptible d'empêcher la transformation lymphoblastique ; nos malades n'ont jamais reçu de PAS, mais nous ignorons dans quelle mesure ce médicament n'a pas été utilisé par les autres auteurs.

c) L'âge.

On peut penser qu'il existe aussi une influence de l'âge sur le TTL. Chez les personnes âgées, on a remarqué — Kerby (26), Lewi (29) — une diminution de la sensibilité à la tuberculine, autant pour les tests cutanés que pour le test *in vitro* d'induction

lymphoblastique. Nous ne connaissons pas malheureusement la moyenne d'âge des cas observés par les autres auteurs.

Pour ce qui nous concerne, nous avons eu dans notre groupe de malades tuberculeux une majorité d'enfants et d'adultes jeunes.

B. *Des facteurs propres à notre technique :*

a) Les critères de positivité.

Nos cultures témoins de lymphocytes dans lesquelles nous n'avons pas ajouté de tuberculine, ont toujours été négatives. Nous nous sommes, pour cette raison, autorisés à compter pour positives les cultures dans lesquelles nous avons eu au moins 1 % de lymphocytes transformés.

b) Le choix de la tuberculine et la concentration.

Nous avons utilisé la tuberculine de l'OMS.

Ayant fait aussi quelques TTL avec la tuberculine IP 48, nous avons comparé son action blastogénique avec celle de la tuberculine de l'OMS. Il apparaît de façon très nette que l'on obtient davantage de TTL positifs avec des pourcentages de cellules transformées plus élevés en employant la tuberculine de l'OMS. La puissance blastogénique de cette tuberculine est peut-être très importante, plus importante que celle des autres tuberculines utilisées.

Après avoir confronté d'une façon globale nos résultats avec ceux des autres, nous avons, pour terminer, comparé nos travaux avec ceux de trois groupes d'auteurs qui ont comme nous mis en parallèle le pourcentage du TTL à la tuberculine et le diamètre de l'IDR.

En utilisant une méthode de mesure par précurseurs radioactifs avec la thymidine tritiée, Gump (14) dit ne pas avoir trouvé de relation apparente entre le pourcentage de transformation lymphoblastique et le diamètre de l'IDR dans un groupe de sujets sains et dans un groupe de malades tuberculeux.

McFarland et Heilman (32) avaient un groupe de 21 sujets hétérogènes, puisque certains étaient des malades ambulatoires, mais sans tuberculose active. Avec 500 mcg/ml de PPD-S, ils ont obtenu une corrélation qui, sans être parfaite, est meilleure que la nôtre dans notre groupe de témoins.

Par contre, Kerby (26), en utilisant la méthode faisant appel à la thymidine tritiée, a obtenu des résultats intéressants : dans un groupe de sujets normaux, le coefficient de corrélation (r) pour la relation entre la grandeur de l'induration cutanée et le degré de transformation *in vitro* était de + 0,82 et de + 0,72 pour les malades tuberculeux ; Kerby fait remarquer que, pour obtenir un tel résultat, il a, pour les sujets qui ne réagissaient pas au test cutané de 5 unités de PPD-S, employé une injection intradermique de 250 unités de cette même tuberculine, ce qui est, évidemment, tout à fait inhabituel. En comptant seulement les sujets qui réagissaient avec 5 unités de PPD-S, le coefficient r avait alors moins de signification. Pour les sujets normaux, il était de + 0,59 et de + 0,63 pour les malades tuberculeux.

En fait, les résultats exposés ci-dessus sont peu concordants, et surtout trop isolés. On ne pourra tirer de conclusions définitives sur la relation entre le pourcentage de transformation lymphoblastique et le diamètre de l'IDR que lorsque l'on aura un nombre plus grand d'expérimentations.

PERSPECTIVES D'AVENIR

Nous venons de voir, au cours de ce travail, que le petit lymphocyte, longtemps considéré comme une cellule arrivée en fin d'évolution, était au contraire une cellule capable de se transformer en une grande cellule souche basophile qui se multiplie activement.

On pense maintenant qu'il existe en fait au moins deux populations de lymphocytes, l'une minoritaire à vie courte de 2 à 3 jours, l'autre majoritaire à vie longue de 100 à 200 jours [Cazal (8)]. C'est dans la lymphe que les lymphocytes à vie longue sont les plus nombreux, 90 %, puis dans les ganglions, 75 %, puis dans le sang, 60 %. Au contraire, les lymphocytes à vie courte sont majoritaires dans le thymus et dans la moelle osseuse (95 à 100 %). Pour Cazal, l'activation et la multiplication sont le propre des lymphocytes à vie longue. On pense aussi que, parmi ces derniers, il y aurait une population de lymphocytes responsables des réactions immunitaires de l'hypersensibilité retardée et une autre population de lymphocytes, responsables de réactions immunitaires d'hypersensibilité immédiate capables de produire des anticorps sériques en plus ou moins grande quantité, mais qui seraient non immunisants.

Chez les individus, dont l'allergie tuberculinique est positive, l'IDR à la tuberculine visualise au niveau de la peau les réactions d'hypersensibilité retardée. Chez ces mêmes individus, au niveau

du sang, que l'on sait avoir une population majoritaire de lymphocytes à vie longue, le TTL a permis de mettre en évidence des lymphocytes responsables des phénomènes d'hypersensibilité retardée mais aussi d'autres lymphocytes capables de synthétiser des anticorps sériques, des I.G.E. en particulier, non immunisants.

En fait, il est probable que l'hétérogénéité de la population lymphocytaire ne se limite pas à ces dualités et qu'il existe entre les différentes populations de lymphocytes des interférences que nous ignorons encore.

Pour CANETTI, la tuberculinisation par l'IDR n'est pas une opération indifférente. Chez un nombre important de sujets, elle exalte la propriété qu'elle a charge d'extérioriser. Cela est valable en particulier chez les tuberculeux en pleine évolution où l'on peut craindre une réaction phlycténulaire importante ainsi qu'une activation rare mais toujours possible du foyer tuberculeux. Chez ces sujets, l'IDR peut donc être dangereuse. Elle est donc contre-indiquée.

La technique du TTL a permis de mesurer la sensibilisation à la tuberculine sans que cela représente le moindre inconvénient pour le sujet, si ce n'est la prise de quelques centimètres cubes de sang. Cette technique a aussi l'avantage sur l'IDR d'être une mesure quantitative de la sensibilité tuberculeuse, peut-être plus objective.

Il n'en reste pas moins que les causes d'erreur liées à l'activité et à la qualité des tuberculines sont comparables dans l'un et l'autre test. Malgré l'amélioration accomplie dans la purification des tuberculines, ces substances ne peuvent être considérées comme des entités chimiques et certaines erreurs sont inhérentes à des substances non spécifiques contenues dans certaines préparations, en particulier la vieille tuberculine utilisée à de fortes concentrations.

Il nous semble donc que le TTL à la tuberculine pratiqué dans nos conditions (50 u.) présente un double intérêt.

Sur le plan pratique ;

Il est sûrement moins sensible que le test cutané pour la mise en évidence de l'« allergie » chez des sujets sains. Mais il semble représenter une méthode utile chez les tuberculeux pour tester globalement l'état de leurs défenses immunitaires ; il a donc une signification pronostique qu'il faudrait analyser avec plus de précision.

Sur le plan théorique :

Le TTL ne semble pas explorer les mêmes phénomènes que le test cutané. Comme on connaît bien le rôle de l'hypersensibilité retardée dans la genèse des lésions tuberculeuses, ce moyen d'exploration peut nous faire déboucher sur un éclaircissement de la pathologie et de la physiopathologie des lésions tuberculeuses.

CONCLUSIONS

Le test de transformation lymphoblastique (TTL) à la tuberculine a été mis en œuvre chez 123 sujets de tous âges et comparé au test classique de l'intradermo-réaction à la tuberculine.

Les conclusions suivantes se dégagent de cette étude :

1. *Résultats globaux :*

   A. Chez les sujets à intradermo-réaction négative, le TTL est pratiquement toujours négatif.

   B. Chez les sujets sains à intradermo-réaction positive, le TTL est positif dans 50 % des cas environ, mais les taux de transformation sont très bas, restant aux alentours de 3 %.

   C. Chez les sujets présentant une tuberculose évolutive, le TTL est positif dans 93 % des cas et les taux de transformation sont beaucoup plus élevés (moyenne 10 %).

   D. Il n'a pas été possible d'établir une corrélation significative entre les taux de positivité du TTL et l'intensité des réactions cutanées.

2. *Analyse technique :*

La technique utilisée pour le TTL joue un rôle capital dans l'interprétation. Il faut souligner les faits suivants :

   A. Les tuberculines utilisées n'ont pas toutes le même pouvoir « blastogène ». Dans notre expérience, la tuberculine IP 48

a été beaucoup moins active que la tuberculine standard de l'OMS utilisée aux mêmes doses.

L'antigène de Middlebrook a donné 46 % de résultats positifs chez les tuberculeux (au lieu de 93 % avec la tuberculine) et les taux de positivité sont restés faibles (2 % en moyene)

B. La quantité de tuberculine introduite dans les tests semble un facteur prédominant pour l'interprétation. Les résultats les plus fortement positifs ont été obtenus par des doses voisines de 50 unités. Les très fortes quantités préconisées par certains auteurs (200 u.) nous ont paru donner des résultats non spécifiques et n'ont pas été utilisées pour les tests de routine.

C. La lecture des tests est grandement facilitée par une méthode standardisée de filtration du sang sur coton hydrophile, qui élimine à peu près totalement les cellules non lymphoïdes, à l'exception des éosinophiles.

3. *La comparaison des résultats de la littérature,* entre eux et avec nos propres résultats, est difficile et décevante, à cause même des très nombreuses différences techniques selon les auteurs consultés.

4. *On peut dire que, dans l'ensemble,* le TTL explore les défenses immunitaires du sujet avec beaucoup plus de finesse que l'intradermo-réaction. Il permet, en particulier, de séparer nettement les sujets malades des sujets sains à intradermo-réaction positive.

Au cours de la tuberculose-maladie, une forte positivité rencontrée surtout chez des sujets jeunes, recevant une chimiothérapie appropriée et en voie de stabilisation, semble avoir une signification pronostique favorable, en témoignant de la bonne qualité des défenses immunitaires.

SERMENT

En présence de mes maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Reconnaissant envers mes maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères, et s'ils devaient apprendre la médecine ou recourir à mes soins, je les instruirai et les soignerai sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de ma vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Vu, le Président de l'Université de Bordeaux II

H. BRICAUD

Bon à imprimer

Le Président de thèse P. DU PASQUIER.

Vu et permis d'imprimer

Bordeaux le 16 avril 1971

Le Chancelier des Universités J. BABIN

BIBLIOGRAPHIE

1. Aspegren (N.) and Rorsman (H.). — Mitosis-stimulating effects of tuberculin on lymphocytes from peripheral blood. *J. Allergy*, 1964, *35*, 433-437.

2. Bach (F.), and Hirschhorn (K.). — Lymphocyte interaction : A potential histocompatibility test in vitro. *Science*, 1964, *143*, 813-814.

3. Brandt (L.), Borteson (T.), Norden (A.) and Olsson (T.). — Separation of lymphocytes from peripheral blood by means of a glass wool column. A method for in vitro culture of lymphocytes. *Acta. Med. Scandinav.*, 1962, *172*, 459.

4. Caron (G. A.). — Lymphocyte transformation induced by different doses of tuberculin as measured by tritiated thymidine uptake. *Int. Arch. Allergy*, 1966, *30*, 331-334.

5. Caron (G. A.). — Duration of exposure of lymphocytes to antigen in vitro needed to induce blast transformation. *Int. Arch. Allergy*, 1967, *32*, 98-103.

6. Caron (G. A.) and Sarkany (I.). — Lymphoblast transformation in sulphonamide sensitivity. *Brit. J. Derm.*, 1965, *77*, 556-559.

7. Caron (G. A.) and Sarkany (I.). — Role of plasma factors in the transformation of peripheral blood lymphocytes into lymphoblasts. *Nature*, Lond., 1966, *210*, 314-315.

8. Cazal (P.). — L'apparente dualité du système lymphoïde. *La Presse médicale*, 5 nov. 1966, *74*, 2469-2474.

9. Cowling (D. C.) and Quaglino (D.). — Effect of some antigens on leucocyte cultures. *J. Path. Bact.* 1965, *89*, 63-70.

10. Cowling (D. C.), Quaglino (D.) and Davidson (E.). — Changes induced by tuberculin in leucocyte cultures. *Lancet*, 1963, *2*, 1091-1094.

11. Debray-Sachs (M.) et Dormont (J.). — Isolement des lymphocytes à partir du sang circulant chez l'homme normal et urémique. *Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol.*, 1968, *XIII*, 413-416.

12. Elves (M. W.), Roath (S.) and Israels (M. C. G.). — The response of lymphocytes to antigen challenge in vitro. *Lancet*, 1963, *1*, 806-807.

13. Elves (M. W.), Roath (S.), Taylor (G.) and Israels (M. C. G.). — The in vitro production of antibody lymphocytes. *Lancet*, 1963, *1*, 1292-1293.

14. Gump (D. W.), Fekety (F. R.) jr., Urbanetti (J.) and Nosenzo (C.). — Studies of human leukocyte culture as an in vitro test of delayed hypersensitivity. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 1967, *95*, 470-476.

15. Halpern (B.), Ky (N. T.), Amache (N.), Lagrue (G.) et Hazard (J.). — Diagnostic de l'allergie médicamenteuse in vitro par l'utilisation du TTL. *La Presse médicale*, 1967, *75*, n° 10, 461.

16. Harris (T. N.), Grimm (E.), Mertens (E.) and Ehrich (W. E.). — The role of the lymphocyte in antibody formation. *J. Exp. Med.*, 1945, *81*, 73.

17. Harris (T. N.) and Harris (S.). — Histochemical changes in lymphocytes during the production of antibodies in lymph nodes of rabbits. *J. Exp. Med.*, 1949, *90*, 169.

18. Harris (S.) and Harris (T. N.). — Studies on the transfer of lymph node cells. III Effects of variation in the interval between the injection of antigen into the donor and collection of its lymph node cells. *J. Exp. Med.*, 1954, *100*, 269.

19. Hartog (M.), Cline (M. J.) and Grodsky (G. M.). — The response of human leucocyte cultures to stimulation by tuberculin and phytohemagglutinin measured by the uptake of radioactive thymidine. *Clin. Exp. Immunol.*, 1967, *2*, 217-228.

20. Heilman (D. H.) and Mc Farland (W.). — Mitogenic activity of bacterial fractions in lymphocyte cultures. I purified protein derivative and polysaccharides of tuberculin. *J. Immunol.*, 1966, *96*, 988-991.

21. Heilman (D. H.) and Mc Farland (W.). — Inhibition of tuberculin induced mitogenesis in cultures of lymphocytes from tuberculous donors. *Int. Arch. Allergy*, 1966, *30*, 58-66.

22. Hirschhorn (K.), Bach (F.), Kolodney (R. L.), Firschein (I. C.) and Hashem (N.). — Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Science,* 1963, *142,* 1185-1187.

23. Hirschhorn (K.), Schreibman (R. R.), Bach (F. H.) and Siltzbach (L. E.). — In vitro studies of lymphocytes from patients with sarcoidoses and lymphoproliferative diseases. *The Lancet,* 1964, *2,* 842-843.

24. Hungerford (D. A.). — Leucocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic K C L. *Stain Technology,* 1965, *40,* 333-338.

25. Hungerford (D. A.), Donelly (A. J.), Nowell (P. C.) and Beck (S.). — The chromosome constitution of a human phenotypic intersesc. *Amer J. hum. Genet.,* 1959, *11,* 215-235.

26. Kerby (G. R.). — Correlation of tuberculin skin reaction with in vitro lymphocyte transformation. *Amer. Rev. Resp. Dis.,* 1968, *97,* 904-908.

27. Kochman (S.), Charreire (J.), Doco et Dubois de Montreynaud (J.-M.). — Intérêt du test de transformation lymphoblastique dans le diasgnostic de l'hypersensibilité retardée et dans l'allergie médicamenteuse. *Médecine et Hygiène,* 14 janv. 1970, n° 900, 57.

28. Kravis (L. P.), Gordon (J.), Donski, Lecks (H. I.) and Bhagwat (S.). — Detection of tuberculin sensitivity in children by leukocyte culture. *Amer. Jour. of Dis. of child.,* 1968, *115,* 247-252.

29. Lewi (S.). — Allergie cutanée tuberculinique et transformation blastique des lymphocytes cultivés « in vitro » en présence de tuberculine. Corrélation chez 208 sujets âgés. *Ann. Inst. Pasteur,* 1970, *5,* 630-645.

30. Lycette (R. R.) and Pearmain (G. E.). — Further observations on antigen induced mitosis. *Lancet,* 1963, *2,* 386.

31. Lycette (R. R.), Pearmain (G.) and Fitzgerald (P. H.). — Simplified culture techniques in chromosome analysis. *The Lancet,* 1962, *2,* 1173.

32. Mc Farland (W.) and Heilman (D. H.). — Comparison of lymphocyte transformation and intradermal reactions to tuberculins. *Amer. Rev. Resp. Dis.,* 1966, *93,* 742-748.

33. Marshall (W. H.) and Roberts (K. B.). — Tuberculin induced mitosis in peripheral blood leucocytes. *Lancet,* 1963, *1,* 773.

34. Matsianiotis (N.), Tsenghi (G.), Economou-Mavrou (C.) and Metaxotoustavridaki (C.). — Skin hypersensitivity and in vitro lymphocytic reactivity to tuberculin in childhood. *The journal of Pediatrics,* 1968, *72,* 599-605.

35. Maupin (B.) et Geneste (J.). — Une technique de séparation des lymphocytes du sang humain. *C. T. Société de Biologie,* séance du 23 nov. 1968, 1895-1897.

36. Moorhead (P. S.), Nowell (P. C.), Mellman (W. J.), Battips (D. M.) and Hungerford (D. A.). — Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exper. Cell. Res.,* 1960, *20,* 613.

37. Morgan (J. F.), Morton (R. J.) and Parker (R. C.). — Nutrition of animal cells in tissue culture. I Initial studies on a synthetic medium. *Proc. Soc. Exp. Biol.,* 1950, *73,* 1.

38. Pearmain (G.), Lycette (R. R.) and Fitzgerald (P. H.). — Tuberculin induced mitosis in peripheral blood leucocytes. *The Lancet,* 1963, *1,* 637-638.

39. Policard (A.) et Bessis (M.). — Le lymphocyte. Points de vue de l'histologiste et de l'hématologiste. *Revue d'hématologie,* 1960, *15,* 271-274.

40. Quaglino (D.), Hayhoe (F. G. J.) and Flemans (R. J.). — Cytochemical observations on the effect of phytohemagglutinin in short-term tissue cultures. *Nature,* Lond., 1962, *196,* 338-340.

41. Ranvier (L.). — Des Clasmocytes. *Arch. Anat. Microscop. Morph. Exp.,* 1900, *3,* 123.

42. Rauch (H. C.). — Response of leukocytes in culture from tuberculous patients and vaccinated subjects. *Amer. Rev. Resp. Dis.,* 1967, *95,* 220-223.

43. Ricci (M.), Passaleva (A.), Ricca (M.), Romagnani (S.) and Bagnoni (E.). — Lymphocyte reaction to PPD, anti-PPD hemagglutinating antibodies, and tuberculin cutaneous reactivity in tuberculous and non-tuberculous patients. *The Lancet,* 1966, *2,* 1031.

44. Rich (A. R.). — Inflammation in resistance to infection. *Arch. Path.,* 1936, *22,* 228.

45. Schrek (R.). — Cell transformations and mitoses produced in vitro by tuberculin purified protein derivative in human blood cells. *Amer. Rev. Resp. Dis.,* 1963, *87,* 734-738.

46. Seibert (F. B.) and Glenn (J. T.). — Tuberculin purified protein derivative. Preparation and analyses of a large quantity for standard. *Amer. Rev. Tuberc.*, 1941, *44*, 9-25.

47. Seibert (F. B.), Soto-Figueroa (E.) and Dufour (E. H.). — Isolation, Identification, and classification of proteins of tuberculin and the tubercle bacillus. *Amer. Rev. Tuberc. Pulm. Dis.*, 1955, *71*, 704-721.

48. Seibert (F. B.), Stacey (M.) and Kent (P. W.). — An antigenic polysaccharide, « polysaccharide II » isolated from tuberculin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1949, *3*, 632-640.

49. Smithwick (E. M.) and Berkovich (S.). — In vitro suppression of the lymphocyte response to tuberculin by live measles virus. *Proc. Soc. exp. Biol.*, N. Y., 1966, *123*, 276-278.

50. Timofejemski (A. D.) and Benewelenskaja (S. W). — Explantationsversuche von weissen Blutkörperchen mit Tuberkelbazillen. *Arch. exp. Zellforsch*, 1925, *2*, 31-42.

51. Timofejemski (A. D.) and Benewelenskaja (S. W.). — Tuberculous inoculation in the cultures of leukocytes of the human blood. *Arch. exp. Zellforsch*, 1927, *4*, 64-78.

52. Walford (R. L.), Gallagher (R.) and Sjaarda (J. R.). — Serologic testing of human lymphocytes with immune serum obtained after homografting. *Science*, 1964, *144*, 868.

53. Wuttke (H.). — On the quantitative functional analysis of an inhibitory factor for lymphocyte transformation in cell cultures following tuberculin addition in the blood plasma of patients suffering from tuberculosis. *Klin Wschr.*, 1968, *46*, 716-719.

ACHEVÉ D'IMPRIMER
LE 4 MAI 1971
SUR LES PRESSES
IDÉES/SERVICES
Avenue de Berlincan
SAINT-MÉDARD-EN-JALLES
PRÈS BORDEAUX

Dépôt légal 2e trimestre 1971